PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :
C12N 15/86, 15/11 // 15/67

A1

(11) Numéro de publication internationale: **WO 98/49334**

(43) Date de publication internationale: 5 novembre 1998 (05.11.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00849

(22) Date de dépôt international: 28 avril 1998 (28.04.98)

(30) Données relatives à la priorité:
97/05203 28 avril 1997 (28.04.97) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F–75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: LOPEZ LASTRA, Marcelo [CL/FR]; 34, rue de Bourg, F–69007 Lyon (FR). GABUS–DARLIX, Caroline [FR/FR]; 11, les Genêts, F–69630 Chaponost (FR). DARLIX, Jean–Luc [FR/FR]; 11, les Genêts, F–69630 Chaponost (FR).

(74) Mandataires: MARTIN Jean–Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F–75116 Paris (FR).

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

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(54) Title: NOVEL INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE AND VECTOR CONTAINING SAME

(54) Titre: NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES ET VECTEUR LE CONTENANT

(57) Abstract

The invention concerns the use of a nucleotide sequence derived from all or part of the genomic RNA 5' end of a type C retrovirus except for Friend murine leukaemia virus (FMLV) and Moloney murine leukaemia virus (MoMLV) as internal ribosome entry site or as element enabling or improving retrovirus vector packaging. The invention also concerns a vector comprising said nucleotide sequence, a viral particle generated from this vector, a cell comprising this vector or infected by the viral particle, their therapeutic use and a pharmaceutical composition containing them. The invention further concerns the use of a vector, a viral particle or a pharmaceutical composition for transfecting or infecting pluripotent stem cells.

(57) Abrégé

La présente invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV) à titre de site interne d'entrée des ribosomes ou d'élément permettant ou améliorant l'encapsidation de vecteurs rétroviraux. Elle a également pour objet un vecteur comprenant ladite séquence nucléotidique, une particule virale générée à partir de ce vecteur, une cellule comprenant ce vecteur ou infectée par la particule virale, leur utilisation thérapeutique ainsi qu'une composition pharmaceutique les comprenant. Enfin, elle a trait à l'utilisation d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une composition pharmaceutique pour la transfection ou l'infection de cellules pluripotentes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

AL	Albanie	**ES**	Espagne	**LS**	Lesotho	**SI**	Slovénie
AM	Arménie	**FI**	Finlande	**LT**	Lituanie	**SK**	Slovaquie
AT	Autriche	**FR**	France	**LU**	Luxembourg	**SN**	Sénégal
AU	Australie	**GA**	Gabon	**LV**	Lettonie	**SZ**	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	**GB**	Royaume-Uni	**MC**	Monaco	**TD**	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	**GE**	Géorgie	**MD**	République de Moldova	**TG**	Togo
BB	Barbade	**GH**	Ghana	**MG**	Madagascar	**TJ**	Tadjikistan
BE	Belgique	**GN**	Guinée	**MK**	Ex-République yougoslave de Macédoine	**TM**	Turkménistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Grèce			**TR**	Turquie
BG	Bulgarie	**HU**	Hongrie	**ML**	Mali	**TT**	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	**IE**	Irlande	**MN**	Mongolie	**UA**	Ukraine
BR	Brésil	**IL**	Israël	**MR**	Mauritanie	**UG**	Ouganda
BY	Bélarus	**IS**	Islande	**MW**	Malawi	**US**	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	**IT**	Italie	**MX**	Mexique	**UZ**	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	**JP**	Japon	**NE**	Niger	**VN**	Viet Nam
CG	Congo	**KE**	Kenya	**NL**	Pays-Bas	**YU**	Yougoslavie
CH	Suisse	**KG**	Kirghizistan	**NO**	Norvège	**ZW**	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**NZ**	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			**PL**	Pologne		
CN	Chine	**KR**	République de Corée	**PT**	Portugal		
CU	Cuba	**KZ**	Kazakstan	**RO**	Roumanie		
CZ	République tchèque	**LC**	Sainte-Lucie	**RU**	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Soudan		
DK	Danemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Suède		
EE	Estonie	**LR**	Libéria	**SG**	Singapour		

Nouveau site interne d'entrée des ribosomes et vecteur le contenant

La présente invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de l'ADN proviral d'un virus de la réticuloendothéliose à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) et/ou pour améliorer l'encapsidation rétrovirale. Plus particulièrement, elle concerne des vecteurs d'expression comportant cette séquence et notamment des vecteurs polycistroniques permettant l'expression efficace et stable de plusieurs gènes d'intérêt sous la dépendance d'un même promoteur. La présente invention trouve une application intéressante dans le domaine des vecteurs de thérapie génique.

La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De nombreux documents de l'art antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une manière générale, les vecteurs sont obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être propagés dans une lignée de complémentation qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour générer une particule virale défective pour la réplication mais capable d'infecter une cellule hôte. A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés mais on peut citer également des vecteurs issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus, poxvirus et virus de l'herpès. Ce type de vecteurs, leur organisation et leur mode d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

A titre indicatif, le génome rétroviral est constitué par un ARN linéaire, simple brin et de polarité positive. Outre les séquences de régulation R et U5 et

U3 et R présentes aux extrémité 5' et 3' respectivement, il porte trois gènes : *gag* codant pour les protéines de la capside, *pol* codant pour la transcriptase inverse et l'intégrase et *env* codant pour les protéines de l'enveloppe. Les signaux d'encapsidation, situés en aval des séquences U5 jusqu'au début de la région codante du gène *gag*, participent à la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN viral dans les particules virales. L'extrémité 5' du génome comprend une coiffe (cap) et l'extrémité 3' est polyadénylée. Lors du cycle infectieux, l'ARN viral est converti en un ADN proviral linéaire, double brin muni à chaque extrémité de séquences répétées inversées LTRs (pour Long Terminal Repeat en anglais) nécessaires à l'initiation de la transcription. Celle-ci, réalisée par la machinerie cellulaire, permet la production des ARN génomiques et subgénomiques à partir desquels sont synthétisées les protéines virales. Les rétrovirus peuvent être classés en 4 sous-familles A à D, sur la base de leur morphologie. Le type C regroupe la majorité des rétrovirus dont les virus MLV (Murine Leukemia Virus) et MSV (Murine Sarcoma Virus) utilisés dans la plupart des vecteurs de thérapie génique et les virus REV (Reticuloendotheliosis Virus) d'où dérive la séquence nucléotidique de la présente invention.

Il peut être avantageux de disposer de vecteurs de thérapie génique plus performants et capables notamment de produire efficacement plusieurs protéines d'intérêt. Cependant, la présence de plusieurs promoteurs au sein du même vecteur se traduit très souvent par une réduction voire même une perte de l'expression au cours du temps. Ceci est dû à un phénomène bien connu d'interférence entre les séquences promotrices. Dans ce contexte, la publication de la demande internationale WO93/03143 propose une solution à ce problème qui consiste à mettre en oeuvre un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Elle décrit un vecteur rétroviral dicistonique pour l'expression de deux gènes d'interet placés sous le contrôle du même promoteur. La présence d'un site IRES de picornavirus entre ceux-ci permet la production du produit d'expression issu du second gène d'intérêt par initiation interne de la traduction de l'ARNm

dicistronique.

Normalement, l'entrée des ribosomes au niveau de l'ARN messager (ARNm) se fait par la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ensemble des ARNm eucaryotes. Les sous unités ribosomales 40S se déplacent le long de l'ARN jusqu'à rencontrer un codon AUG approprié pour débuter la synthèse protéique. Généralement, l'initiation a lieu au niveau du premier codon AUG. Mais, si celui-ci est dans un contexte peu favorable, les sous unités 40S poursuivent jusqu'à un codon AUG ultérieur situé dans un meilleur contexte traductionnel (Kozak, 1984, Nucleic Acid Res. *12*, 3873-3893 ; Kozak, 1991, J. Biol. Chem. *266*, 19867-19870 ; Pain, 1996, Eur. J. Biochem. *236*, 747-771).

Cependant, cette règle universelle connaît des exceptions. L'absence de coiffe chez certains ARNm viraux laissait supposer l'existence de structures alternatives permettant l'entrée des ribosomes à un site interne de ces ARN. A ce jour, un certain nombre de ces structures, nommées IRES du fait de leur fonction, ont été identifiées dans la région 5' non codante des ARNm viraux non coiffés comme celle notamment des picornavirus tel que le virus de la poliomyélite (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol. *8*, 1103-1112) et l'EMCV (Encephalomyocarditis virus (Jang et al., 1988, J. Virol. *62*, 2636-2643). Des ARNm cellulaires possédant des éléments IRES ont également été décrits. On peut citer ceux codant pour la protéine BIP (pour Immunoglobulin heavy chain binding protein ; Macejak et Sarnow, 1991, Nature *353*, 90-94), certains facteurs de croissance (Teerink et al., 1995, Biochem. Biophy. Acts *1264*, 403-408 ; Vagner et al., 1995, Mol. Cell. Biol. *15*, 35-44), le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Gan et Rhoads, 1996, J. Biol. Chem. *271*, 623-626) et deux facteurs de transcription de levure TFIID et HAP4 (Iizuka et al., 1994, Mol. Cell. Biol., *14*, 7322-7330). Des sites IRES ont également mis en évidence dans les rétrotransposons murins de type VL30 (Berlioz et al., 1995, J. Virol. *69*, 6400-6407) et, plus récemment dans les ARNm codant pour le précurseur gag des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV)

(Berlioz et Darlix, 1995, J. Virol. *69*, 2214-2222 ; Vagner et al., 1995, J. Biol. Chem. *270,* 20376-20383).

On a maintenant trouvé un nouveau site interne d'entrée des ribosomes dans la région 5' non codante de l'ARN du virus aviaire de la réticuloendothéliose (REV) de type A (REV-A) et montré son efficacité pour initier la traduction de séquences codantes placées à sa suite d'une manière monocistronique ou dicistonique.

Le site IRES de la présente invention est particulièrement avantageux par rapport à ceux déjà décrits dans la littérature. En premier lieu, il permet un taux d'expression important du cistron qu'il contrôle. En outre et, de manière inattendue, il peut également, dans le cadre d'un vecteur rétroviral, contribuer ou améliorer, en association avec une région d'encapsidation appropriée, les fonctions de dimérisation ou d'encapsidation, permettant une augmentation du titre viral. Et enfin, du fait de sa faible homologie avec les séquences rétrovirales murines utilisées dans la plupart des vecteurs de thérapie génique destinés à un usage humain, son emploi réduit considérablement le risque de production de virus compétents pour la réplication.

La plupart des protocoles de thérapie génique approuvés par le RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) aux Etats Unis utilisent des vecteurs dérivés du virus MoMLV. A l'heure actuelle, le choix d'un vecteur rétroviral spécifique pour une application thérapeutique donnée reste empirique et les facteurs influençant le titre viral et l'expression des gènes n'ont pas encore été clairement élucidés. L'étude des séquences agissant *en cis* qui contrôlent l'encapsidation et l'établissement des forces relatives de divers éléments IRES peuvent permettre d'optimiser les vecteurs de thérapie génique en termes de titre et d'expression génique. Un des buts de la présente invention est de proposer de nouveaux vecteurs rétroviraux susceptibles d'être propagés à haut titre et de permettre une expression optimale d'un ou plusieurs gènes d'intérêt.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'une

séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV), à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) dans un vecteur et/ou pour permettre ou améliorer l'encapsidation d'un vecteur rétroviral.

Par séquence nucléotidique, on entend une séquence composée de ribo (ARN) ou de désoxyribonucléotides (ADN). Dans le cadre de la présente invention, l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus correspond au quart 5' dudit ARN qui s'étend du site d'initiation de la transcription (nucléotide +1) jusqu'à environ 2 kb dans la direction 3'. Le terme rétrovirus est largement défini dans les ouvrages de base de virologie accessibles à l'homme de l'art et les caractéristiques essentielles ont été résumées à titre indicatif ci-dessus. Le terme "dérivée" fait référence à une séquence ayant une origine rétrovirale de type C, mais qui peut avoir subi au moins une modification par rapport à la séquence native. La ou les modifications envisageables incluent la délétion, l'addition, la substitution et/ou la mutation d'un ou plusieurs nucléotides (nt). De telles modifications peuvent avoir pour but par exemple d'accroître les fonctions IRES, d'encapsidation ou d'introduire des sites de restriction adéquates pour faciliter les étapes de clonage ultérieures. Le terme "dérivée" comprend également l'équivalent ADN de l'ARN génomique sous une forme modifiée ou non.

Par IRES, on désigne un site capable de promouvoir l'entrée des ribosomes dans une molécule d'ARN d'une manière indépendante de la coiffe. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la fonction IRES peut s'exercer dans tout vecteur ou cassette d'expression. Une séquence en usage dans le cadre de la présente invention peut également agir en tant qu'élément activateur de l'encapsidation des rétrovirus ou vecteurs rétroviraux en favorisant la dimérisation de deux copies du génome rétroviral et/ou l'encapsidation du dimère dans les particules virales. Selon un mode de réalisation préféré, ladite séquence est capable d'exercer une fonction IRES et d'améliorer la fonction

d'encapsidation lorsqu'elle est introduite dans un vecteur rétroviral approprié.

Une séquence nucléotidique telle qu'utilisée dans le cadre de la présente invention, peut être isolée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de l'ADN proviral d'un rétrovirus de type C ou de tout plasmide de l'état de la technique portant le fragment rétroviral d'intérêt. Il va sans dire qu'elle peut être générée par toute technique en usage dans le domaine de l'art, par exemple par clonage à l'aide de sondes appropriées, par PCR (Polymerase Chain reaction) ou encore par synthèse chimique. Avantageusement, ladite séquence comprend tout ou partie de la région qui suit le domaine U3 du LTR 5', jusqu'au codon AUG initiateur du gène *gag*. Aux fins de la présente invention, elle comprend au moins 50 nucléotides, avantageusement au moins 100 nucléotides, de préférence au moins 200 nucléotides et de manière préférée au moins 300 nucléotides compris dans ladite extrémité 5'. Mais, bien entendu, elle peut s'étendre au delà dans la direction 5' ou 3' ou comporter des séquences supplémentaires. Avantageusement, ladite séquence comprend de 100 à 1500 nucléotides et, en particulier, de 300 à 800 nucléotides.

On préfère mettre en oeuvre dans le cadre de la présente invention un rétrovirus de type C à l'exception des virus FMLV et MoMLV. Un rétrovirus de type C convenant plus particulièrement, est sélectionné parmi les virus REV (Virus de la réticuloendothéliose), MSV (Murine sarcoma virus) et notamment celui de Moloney (MMSV), MHV (*Mus hortulanus* virus), MEV (Mouse endogenous retrovirus), FMOV (FBR murine osteosarcoma virus), AMLV (AKV murine leukemia virus), MEELV (Mouse endogenous ecotropic murine leukemia virus), SFFV (Friend spleen focus-forming virus), RASV (rat sarcoma virus), FLV (Feline leukemia virus), FSV (feline sarcoma virus), EFLV (Cat endogenous proviral feline leukemia virus), SSV (Simian sarcoma virus), GALV (Gibbon ape leukemia virus) et BAEV (Baboon endogenous virus).

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, une séquence nucléotidique en usage dans la présente invention dérive de tout ou partie de

l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendothéliose (REV). Les virus REV comprennent notamment différents sous-types A, B et T ainsi que les virus DIAV (Duck infectious anemia virus), SNV (spleen necrosis virus) et CSV (Chick syncytial virus) (voir par exemple Encyclopedia of Virology, 1994, Enrietto, Reticuloendotheliosis viruses, p1227-1232 Ed. R. Webster et A. Granoff, Academic Press, Hartourt Brace § Company Publishers). Un virus REV convenant tout particulièrement est le virus de la réticuloendothéliose aviaire, notamment celui de type A (REV-A).

Selon cette dernière variante, on aura de préférence recours à une séquence nucléotidique comprenant au moins 100 nucléotides et au plus 800 nucléotides (nt) de l'extrémité 5' non codante du virus REV-A et plus particulièrement une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à tout ou partie de la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1. A titre d'exemples préférés, on peut citer une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

(i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,

(ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou

(iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

Le terme substantiellement homologue fait référence à un degré d'homologie supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95%. Comme déjà indiqué, ladite séquence nucléotidique peut avoir une séquence légèrement différente de celle décrite dans la SEQ ID NO: 1 ou 2, à la condition toutefois que la ou les modifications n'affecte(nt) pas ses fonctions IRES et/ou d'encapsidation.

Selon un mode avantageux, la séquence nucléotidique utilisée dans le cadre de la présente invention est identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

(i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,

(ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou

(iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

La fonction IRES de ladite séquence nucléotidique est particulièrement avantageuse dans un contexte pauvre en ion magnésium, par exemple dans un contexte cellulaire. Un concentration élevée en ions Mg^{2+} peut diminuer l'efficacité de l'initiation de la traduction médiée par la séquence.

Une séquence nucléotidique en usage dans la présente invention, est plus particulièrement destinée à être intégrée dans un vecteur de transfert et d'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt. Le choix d'un tel vecteur est large et les techniques de clonage dans le vecteur retenu sont à la portée de l'homme de l'art. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut envisager un vecteur plasmidique ou un vecteur dérivé d'un virus animal et, en particulier, d'un poxvirus (canari pox ou virus de la vaccine, notamment Copenhage ou MVA), adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus ou rétrovirus. De tels vecteurs sont largement décrits dans la littérature. En particulier, lorsqu'il s'agit d'un vecteur adénoviral, celui-ci peut être issu d'un adénovirus humain (de préférence de type 2 ou 5), animal (de préférence canin ou bovin) ou encore d'un hybride entre des espèces variées. La technologie générale concernant les adénovirus est divulguée dans Graham et Prevec (1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, the Human Press Inc, p 109-118).

Conformément aux buts poursuivis dans le cadre de la présente invention, ladite séquence nucléotidique est de préférence positionnée en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel celui-ci code. Elle peut être mise en oeuvre dans une cassette d'expression de type monocistronique (pour l'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur) ou polycistronique (pour l'expression d'au moins deux gènes d'intérêt

placés sous le contrôle d'un même promoteur). Cette dernière peut contenir plusieurs éléments en tandem "site IRES-gène d'intérêt" dont au moins un des sites IRES est constitué par une séquence nucléotidique telle que définie auparavant. On préfère tout particulièrement l'utilisation dans une cassette dicistronique soit en amont du premier gène d'intérêt soit en amont du second, cette dernière variante étant la préférée.

Lorsqu'un vecteur selon l'invention comprend plusieurs cassettes d'expression, celles-ci peuvent être insérées dans une orientation quelconque les unes par rapport aux autres, soit dans une même orientation (promoteur agissant dans une même direction) ou en orientation réverse (promoteur agissant dans une orientation opposée). Par ailleurs, un vecteur selon l'invention peut comprendre plusieurs séquences nucléotidiques en usage selon l'invention. Dans ce cas, il est préférable qu'elles dérivent de rétrovirus de type C différents.

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un vecteur selon l'invention dérive d'un rétrovirus. On peut citer à titre d'exemples, les rétrovirus aviaires tels que le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV), le virus de la leucémie aviaire (AVL), le virus du sarcome aviaire (ASV), le virus de la nécrose de la rate (SNV) et le virus du sarcome de Rous (RSV), les rétrovirus bovins, les rétrovirus félins (FLV, FSV....), les rétrovirus murins tels que le virus de la leucémie murine (MuLV), le virus de Friend (FMLV) et le virus du sarcome murin (MSV) et les rétrovirus de primate (GALV, FSV, BAEV...). Bien entendu, d'autres rétrovirus peuvent être mis en oeuvre. Cependant, on préfère tout particulièrement avoir recours au virus MoMLV. Les nombreux vecteurs rétroviraux décrits dans la littérature peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

Les vecteurs rétroviraux envisageables aux fins de la présente invention comprennent au moins les éléments suivants associés d'une manière fonctionnelle : un LTR 5' et un LTR 3' rétroviraux, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et la séquence nucléotidique en usage dans le cadre de la présente invention pour permettre ou améliorer l'encapsidation dudit vecteur dans une particule virale

et/ou à titre de site IRES pour permettre ou favoriser l'expression d'un gène d'intérêt positionné en aval de ladite séquence nucléotidique. Il va sans dire que le LTR 5' rétroviral peut être utilisé comme promoteur mais on peut également avoir recours à un promoteur interne. Par ailleurs, le LTR 5' et éventuellement 3' peuvent avoir la même origine rétrovirale (par exemple REV) que la séquence nucléotidique ou une origine différente. Par exemple, un vecteur monocistronique comprendra de 5' vers 3' un LTR 5', la séquence nucléotidique, un gène d'intérêt et un LTR 3'.

Bien entendu, un vecteur rétroviral selon l'invention peut également comprendre une région d'encapsidation (E+) conventionnelle. Cependant, la présence de cette dernière n'est pas exigée lorsque la séquence nucléotidique en usage dans la présente invention peut exercer à elle-seule la fonction d'encapsidation. Un tel mode de réalisation peut être plus particulièrement envisagé lorsque le LTR 5' rétroviral dérive d'un virus REV et, de préférence du SNV, et la séquence nucléotidique est substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans la SEQ ID NO: 2, commençant au nt 1 et se terminant au nt 578 ou commençant au nt 265 et se terminant au nt 578.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur rétroviral selon l'invention, comprend au moins :

(a) un LTR 5' rétroviral,

(b) une région d'encapsidation,

(c) de manière optionnelle, un premier gène d'intérêt suivi d'une région promotrice interne d'une origine différente de celle dudit LTR 5' rétroviral,

(d) un second gène d'intérêt,

(e) un site IRES,

(f) un troisième gène d'intérêt, et

(g) un LTR 3' rétroviral,

l'un au moins de la région d'encapsidation et du site IRES étant constitué

par ladite séquence nucléotidique en usage selon l'invention.

Dans le cas où le vecteur rétroviral selon l'invention comporte une cassette d'expression dirigée par une région promotrice interne, il est préférable pour favoriser l'expression génique, que celle-ci soit dans une orientation inverse par rapport aux LTRs 5' et 3' rétroviraux. On peut également inclure d'autres éléments, par exemple un autre site IRES et un autre gène d'intérêt ou une autre cassette d'expression.

Un vecteur rétroviral préféré selon l'invention comprend une région d'encapsidation dérivant d'un rétrovirus murin, notamment d'un MoMLV, ou d'un rétrotransposon de type VL30 et un site IRES comprenant une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

(i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,

(ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou

(iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

On peut citer en particulier les vecteurs rétroviraux dicistroniques de type pREV HW-3 et HW-6, dans lesquels la région d'encapsidation dérive d'un MoMLV et le site IRES est constitué par une séquence nucléotidique identique à la séquence présentée dans la SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578 ou commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578. Bien entendu, l'homme du métier peut faire varier les gènes d'intérêt selon l'effet thérapeutique recherché.

Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans l'invention peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute tèchnique conventionnelle de biologie moléculaire. Il peut coder pour un polypeptide correspondant à une protéine native telle que trouvée dans la nature homologue à la cellule hôte ou non, un fragment protéique, une protéine chimérique provenant de la fusion de polypeptides d'origines diverses ou un

mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être généré par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acides aminés. En outre, le polypeptide peut être (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la surface de la cellule hôte ou encore (iii) secrété hors de la cellule hôte et donc comprendre des éléments additionnels appropriés, comme une séquence codant pour un signal de sécrétion ou une région d'ancrage transmembranaire.

On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de Becker, du cancer, du SIDA, de maladies cardiovasculaires (resténose, arthériosclérose, ischémie...) et d'autres maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent pour les protéines suivantes :

- une cytokine et notamment une interleukine (IL-2, IL-7, IL-10, IL-12...), un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),
- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur IX, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,
- une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase, la phosphatase alcaline (plap) et la ß-galactosidase,
- un inhibiteur d'enzyme tel que l'α1-antitrypsine et les inhibiteurs de protéases virales
- un produit d'expression d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1, celui du gène *fur1*

et/ou *fcy1* de *Saccharomyces cerevisiae*, la ricine,

- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,
- une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminose), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,
- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, telles que les produits d'expression des gènes supresseurs de tumeurs, par exemple les gènes p53, p73 et Rb,
- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire, un anticorps, les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité ou une immunotoxine,
- une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives,
- un récepteur cellulaire ou nucléaire ou un de leur ligand,
- un facteur de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial cell Growth Factor...), et
- un inducteur d'apoptose (Bax...), un inhibiteur d'apoptose (Bcl2, BclX...), un agent cytostatique (p21, p16, Rb...), une nitric oxide synthase (NOS), une apolipoprotéine (apoAI, apoE...), une catalase, une SOD, un facteur agissant sur l'angiogénèse (PAI pour Plasminogen Activator Inhibitor...).

Par ailleurs, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut également coder pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées par un vecteur selon l'invention. On peut citer le gène *néo* (néomycine) conferrant une résistance à l'antibiotique G418, le

gène *dhfr* (dihydrofolate réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl Transférase) ou encore le gène *gpt* (xanthine phosphoribosyl).

D'une manière générale, on aura recours pour l'expression d'un ou des gène(s) d'intérêt à un promoteur fonctionnel dans la cellule hôte considérée et, de préférence, une cellule humaine. Le choix du promoteur est très large et à la portée de l'homme du métier. Il peut s'agir d'un promoteur gouvernant naturellement l'expression d'un gène d'intérêt en usage dans la présente invention ou de tout autre promoteur d'une origine quelconque. Par ailleurs, il peut être de nature constitutive ou régulable, notamment en réponse à certains signaux cellulaires tissu-spécifiques ou événements-spécifiques. Par exemple, il peut être avantageux de cibler l'expression du gène d'intérêt au niveau des cellules lymphocytaires dans le cadre du SIDA, des cellules pulmonaires dans le cadre de la mucoviscidose ou des cellules musculaires dans le cadre des myopathies.

A titre d'exemples, les promoteurs convenant dans le cadre de la présente invention peuvent être choisis parmi les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), CMV (Cytomégalovirus), HMG (Hydroxyméthyl-Glutaryl Coenzyme A), TK (Thymidine kinase), les LTRs rétroviraux comme celui du MoMLV, RSV ou du MSV lorsqu'on met en oeuvre un vecteur rétroviral, les promoteurs adénoviraux E1A et tardif MLP (Major Late Promoteur) notamment dans le contexte d'un vecteur adénoviral, les promoteurs 7,5K, H5R, pK1L, p28 et p11 destinés à des vecteurs poxviraux comme le virus de la vaccine, le promoteur PGK (Phosphoglycéro kinase), les promoteurs foie-spécifiques des gènes codant pour l'α1-antitrypsine, le facteur IX, l'albumine et la transferrine, les promoteurs des gènes d'immunoglobulines qui permettent une expression dans les lymphocytes, et enfin les promoteurs des gènes codant pour le surfactant ou la protéine CFTR qui présentent une certaine spécificité pour les tissus pulmonaires. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin.

Invest. *96*, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. *10*, 2738-2748), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. *53*, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy *1*, 170-175), α-fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. *57*, 461-465), APC surexprimé dans les cancers colorectaux, BRCA-1 et 2 (Wooster et al., 1995, Nature *378*, 789-792) surexprimés dans les cancers des ovaires et PSA (pour prostate specific antigen) surexprimé dans les cancers de la prostate.

Par ailleurs, le gène d'intérêt en usage dans la présente invention peut comporter d'autres séquences améliorant son expression, tant au niveau de la transcription que de la traduction ; par exemple une séquence activatrice de la transcription de type enhancer, une séquence intronique, un signal de terminaison de la transcription (polyA) et, comme indiqué précedemment, un signal de sécrétion ou une région transmembranaire.

L'invention couvre également les particules virales générées à partir d'un vecteur viral selon l'invention. On procède généralement par transfection de celui-ci dans une lignée cellulaire adéquate. Si le vecteur viral utilisé est défectif pour la réplication, on aura recours à une lignée de complémentation. D'une manière générale, l'homme du métier connaît les lignées pouvant être employées pour générer des particules virales infectieuses ainsi que le procédé à mettre en oeuvre selon le vecteur utilisé.

Par exemple, dans le cas d'un vecteur adénoviral, on peut avoir recours à la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., *36*, 59-72). S'agissant d'un vecteur rétroviral, on peut envisager d'employer des lignées cellulaires écotropes, comme la lignée CRE (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *85*, 6460-6464) ou GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., *62*, 1120-1124). Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une lignée de complémentation amphotrope telle que la lignée PG13 (Miller et al., 1991, J. Virol., *65*, 2220-2224)

ou Psi Env-am (Markowitz et al., 1988, T.A.A.P. Vol. CI, 212-218). Généralement, on récupère les particules virales infectieuses dans le surnageant de culture des cellules de complémentation transfectées.

L'invention s'étend également aux cellules comprenant un vecteur selon l'invention ou infectées par des particules virales infectieuses selon l'invention. Les méthodes de transfection sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer la technique de précipitation au phosphate de calcium, celle au DEAE dextrane, la microinjection ou l'encapsulation dans des véhicules lipidiques. D'autre part, les vecteurs selon l'invention peuvent être présents dans la cellule hôte sous forme intégrée dans le génome cellulaire ou sous forme d'épisomes aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. La cellule selon l'invention est avantageusement une cellule eucaryote, notamment mammifère et, de préférence, une cellule humaine. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage ...), hépatique, épithéliale, fibroblaste, du système nerveux central et, tout particulièrement, d'une cellule musculaire (myoblaste, myocyte, cellule satellite, muscle lisse...), cardiaque, vasculaire, trachéale, pulmonaire ou du système nerveux central.

La présente invention concerne également l'usage thérapeutique d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique, notamment d'une maladie génétique, d'une maladie acquise comme le cancer ou d'une maladie infectieuse.

Cependant, un tel usage n'est pas limité à une application de type thérapie génique somatique. En particulier, un vecteur selon l'invention peut être utilisé à d'autres fins comme la production par voie recombinante dans des cellules procaryotes ou eucaryotes de produit(s) d'expression codé(s) par au moins un des gènes d'intérêt. Par exemple, on peut envisager la coexpression de deux gènes d'intérêt dans un vecteur d'expression dicistronique utilisant une séquence

nucléotidique selon l'invention. La coexpression d'un gène de resistance à un antibiotique à titre de second cistron peut permettre d'augmenter l'expression d'un premier cistron. Il est possible d'obtenir un produit mature par la coexpression de deux gènes dont le produit d'expression de l'un permet la maturation du polypeptide codé par l'autre (par exemple précurseur polypeptidique et une protéase clivant le précurseur en polypeptide mature). Dans ce cas, on peut avoir recours à des cellules procaryotes (E.coli ...), eucaryotes inférieures (levure, champignon, insecte ...) ou animales. Il s'agira ensuite de récolter et éventuellement purifier ledit produit d'expression d'intérêt du surnageant ou de la culture cellulaire par les techniques conventionnelles. Une autre possibilité d'utilisation consiste en la production d'animaux transgéniques ayant intégré dans leur génome une cassette pour l'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt et comprenant une séquence nucléotidique selon l'invention. Il peut s'agir de souris, rats, lapins, poissons, primates ou d'animaux de ferme (bovins, ovins, porcins ...) Les techniques pour générer ces animaux transgéniques sont connues. Le polypeptide d'intérêt peut être récupéré de manière conventionnelle par exemple dans les fluides biologiques (sang, lait ... etc) de l'animal.

L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur, une particule virale ou une cellule selon l'invention ou un polypeptide d'intérêt obtenu conformément à l'utilisation selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace d'un tel agent à un support, un diluant ou un adjuvant acceptable. Elle peut être administrée selon n'importe quelle route d'administration et ceci en dose unique ou répétée après un certain délai d'intervalle. On préférera notamment l'administration intraveineuse, intramusculaire, intrapulmonaire (éventuellement par aérosolisation) ou intratumorale. La quantité à administrer

sera choisie en fonction de différents critères, en particulier l'usage à titre de traitement ou de vaccin, la voie d'administration, le patient, le type de maladie à traiter et son état d'évolution, la durée du traitement, le vecteur retenu ...etc. A titre indicatif, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu (unité formant des plages), avantageusement entre 10^5 et 10^{13} pfu et, de préférence, entre 10^6 et 10^{11} pfu de particules virales. Une composition à base de vecteur peut être formulée sous forme de doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence, de 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, de 0,1 à 5 mg.

La formulation peut également inclure seul ou en combinaison un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même qu'un agent de solubilisation, de stabilisation ou de conservation. La composition peut être présentée en dose unique ou en multidoses sous forme liquide ou sèche (lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extamporanée par un diluant approprié.

Par ailleurs, l'invention concerne une méthode de traitement de maladies génétiques, cancers et maladies infectieuses selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Selon un premier protocole thérapeutique, on peut les administrer directement *in vivo*, par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, intratumorale ou par aérosolisation dans les poumons. De manière alternative, on peut adopter un protocole de thérapie génique *ex vivo* qui consiste à prélever les cellules d'un patient (cellules souches de la moelle osseuse, lymphocytes du sang périphérique...), à les transfecter avec un vecteur selon l'invention et à les cultiver *in vitro* avant de les réimplanter au patient.

Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une composition pharmaceutique selon l'invention pour la transfection ou l'infection de cellules pluripotentes, notamment de cellules pluripotentes du

système nerveux central.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

La Figure 1 est une représentation schématique des plasmides monocistroniques utilisés comme matrices pour la synthèse *in vitro* d'ARN coiffés et non-coiffés. Ils contiennent le promoteur précoce du cytomégalovirus (Po CMV) utilisable pour l'expression *in vivo*, le promoteur du gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 (Po T7) utilisable pour les expériences *in vitro*, différentes portions de l'extrémité 5' non traduite (leader) du virus REV-A (1 à 578 pour pREV CB-95, 578 à 1 pour pREV CG-53, 1 à 578 délétées des nt 268 à 452 pour pREV CG-54, 265 à 578 pour pREV CG-55 et 452 à 578 pour pREV CG-56) et le gène LacZ (ΔLacZ) codant pour une β-galactosidase tronquée à l'extrémité C-terminale de masse moléculaire d'environ 46 kDa.

La Figure 2 est une représentation schématique des plasmides dicistroniques utilisés comme matrices pour la synthèse *in vitro* d'ARN coiffés et non-coiffés. Ils contiennent le promoteur précoce du cytomégalovirus (Po CMV) utilisable pour l'expression *in vivo*, le promoteur du gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 (Po T7) utilisable pour les expériences *in vitro*, le gène neo, différentes portions de l'extrémité 5' non traduite (leader) du virus REV-A (1 à 578 pour pREV CB-54, 578 à 1 pour pREV CG-50, 1 à 578 délétées des nt 268 à 452 pour pREV CG-52, 265 à 578 pour pREV CB-55 et 452 à 578 pour pREV CG-58) et le gène LacZ (ΔLacZ) codant pour une β-galactosidase tronquée à l'extrémité C-terminale de masse moléculaire d'environ 46 kDa.

La Figure 3 A est une représentation schématique des vecteurs rétroviraux dicistroniques possédant deux éléments d'origine rétrovirale différente, à titre d'IRES et de région d'encapsidation (E) et deux gènes d'intérêt comme les gènes rapporteurs plap codant pour la phosphatase alcaline placentaire et neo codant pour la neomycine phosphotransférase. B) Vecteurs rétroviraux de la série pREV HW possédant des LTRs dérivés de MLV et placés dans un contexte plasmidique pBR322. VL30E+ correspond à la région 5' non traduite de HaMSV et MoMLV

E+ correspond à la région d'encapsidation de MoMLV. C) Vecteur de référence pEMCV-CBTV ayant des LTR et la région d'encapsidation de MoMLV et l'IRES de EMCV. Dans tous les cas, les séquences sont numérotées par rapport au site cap (position +1) de l'ARN génomique.

La Figure 4 illustre l'effet de la rapamycine sur les activités A) phosphatase alcaline et B) neomycine phosphotransférase produites dans les cellules GP+E-86 non transfectées ou transfectées de manière stables par les différents vecteurs pREV HW ou pEMCV-CBTV (pCB100) et traitées par la rapamycine (boîtes pleines) ou non traitées (contrôle, boîtes pointillées).

La Figure 5 illustre l'optimisation du protocole de transduction appliqué aux cellules neuroectodermales Dev. Le pourcentage de cellules Dev transduites par les virus pEMCV-CBTV (IRES EMCV) et pREV HW-3 (IRES REV-A) est déterminé par cytométrie de flux.

EXEMPLES

Les constructions ci-après décrites sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Sambrook et al. (1989, Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les techniques de PCR sont connues de l'homme de l'art et abondamment décrites dans PCR Protocols, a guide to methods and applications (Ed : Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press, Inc.). Les amplifications d'ADN plasmidique sont réalisées dans *Escherichia coli* HB101 souche 1035 (*recA*⁻). Par ailleurs, la position des séquences REV-A utilisées dans les constructions est indiquée par référence à la molécule ARN, la position +1 correspondant au premier nucléotide de la molécule d'ARN, c'est à dire au site d'initiation de la transcription (Darlix et al., 1992, J. Virol. *66*: 7245-7252).

EXEMPLE 1 : Identification d'un site IRES au niveau de l'extrémité 5' leader de l'ARN de REV-A.

Des études de synthèse protéique *in vitro* ont été entreprises à l'aide d'une série de plasmides mono et dicistroniques contenant des fragments du leader 5' de l'ARN génomique REV-A afin de rechercher s'ils permettent la traduction de cistrons par liaison interne des ribosomes.

1. Construction des plasmides mono et dicistroniques.

Les fragments d'ADN correspondant aux séquences 1 à 578, 265 à 578 et 452 à 578 de l'ARN REV-A sont isolés par PCR à partir de la matrice pREVSC-1 (Darlix et al., 1992, J. Virol. *66*, 7245-7252). On utilise des amorces appropriées que l'homme du métier peut concevoir, munies à leurs extrémités d'un site *Nhe*I. Après digestion par cette enzyme, les fragments PCR sont insérés en amont du gène LacZ dans le vecteur pEMCV-M260-837 (Berlioz et al., 1995, J. Virol. *69*, 6400-6407) préalablement clivé par *Nhe*I. Le gène LacZ mis en oeuvre code pour un produit β-galactosidase tronqué à l'extrémité C-terminale. On obtient les plasmides monocistroniques pREV CB-95 (1-578), pREV CG-55 (265-578) et pREV CG-56 (452-578) illustrés à la Figure 1. Les plasmides dicistroniques pREV CB-54 (1-578), pREV CB-55 (265-578) et pREV CG-58 (452-578) sont représentés à la Figure 2 et résultent de l'insertion des fragments PCR précédents entre les gènes *neo* et LacZ de pEMCV-D260-837 (pCB101) (Berlioz et al., 1995, J. Virol. *69*, 6400-6407) également soumis à une digestion par *Nhe*I. L'amplification des nt 1 à 578 délétés des séquences 268 à 452 est réalisée à partir du vecteur pREVSC-1 préalablement digéré par *Kpn*I et *Sac*I, traité par le fragment Klenow de l'ADN polymerase *d'E. coli* et religué. Le fragment amplifié digéré par *Nhe*I est cloné dans pEMCV-M260-837 en amont du gène LacZ ou entre les gènes *neo* et LacZ de pEMCV-D260-837, les

deux vecteurs ayant été digérés par *Nhe*I, pour donner respectivement pREV CG-54 (Fig 1) et pREV CG-52 (Fig 2). Enfin des plasmides contrôles monocistronique pREV CG-53 (Fig 1) et dicistronique pREV CG-50 (Fig 2) ont été construits par introduction du fragment PCR portant les séquences REV-A 1 à 578 dans les vecteurs précédents en orientation inverse (578-1). Dans l'ensemble des constructions contenant les séquences REV-A en orientation sens, l'initiation de la traduction de la β-galactosidase est sous le contrôle du codon AUG du gène gag de REV-A situé en position 574-576, alors que dans les plasmides contrôles, la synthèse de la β-galactosidase dépend d'un AUG placé dans un contexte de Kozak favorable introduit par PCR.

2. Synthèse d'ARN et traduction in vitro.

Les ARN coiffés et non coiffés sont synthétisés à partir de 1 μg d'ADN plasmidique linéarisé par *Ssp*I (position 1240 dans le gène LacZ) à l'aide de l'ARN polymérase T7 (mMessage mMachine ™ ou MAXIscript ™, Ambion) dans un volume réactionnel de 20 μl selon le protocole indiqué par le fournisseur. La transcription est stoppée par traitement de la matrice ADN par l'enzyme DNaseI suivi d'une précipitation des ARN en présence de chlorure de lithium. Les ARN sont repris dans 50 μl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH7,5, EDTA 1mM) avant d'être purifiés et désalés par passage sur une colonne S-300 MicroSpin™ (Pharmacia BioTech) selon les indications du fournisseur. L'intégrité des ARN transcrits est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % contenant du bromure d'éthidium (0,5 μg/ml). La concentration finale en ARN est déterminée spectrophotométriquement.

Les ARN coiffés et non coiffés (10 μg/ml) sont traduits dans le système cellulaire RRL (Promega) utilisé à 50 % de sa concentration initiale en présence de 1 mCi de [^{35}S] méthionine par ml (Amersham) à 31°C pendant 1 h. Le mélange réactionnel est supplémenté par de l'acétate de potassium à une concentration finale de 120 mM. Par ailleurs, l'ARN luciférase est testé dans les

mêmes conditions réactionnelles (témoin positif). Un essai mené en absence d'ARN constitue le témoin négatif. En parallèle, on teste l'effet de la protéase L du virus FMDV (Foot and mouth disease virus) sur la traduction des ARN dicistroniques. Cette protéase clive le facteur d'initiation de la traduction eIF4G entre la glycine en position 479 et l'arginine en position 480 pour générer deux fragments peptidiques dépourvus d'activité initiatrice (Kirchweger et al., 1995, J. Virol. *68*, 5677-5684). En outre, Ohlmann et al. (1995, Nucleic Acid Res. *23*, 334-340 ; 1996, EMBO J. *15*, 1371-1382) a montré que le traitement des lysats de réticulocyte par la protéase L inhibe la traduction *in vitro* des ARN cellulaires coiffés alors que l'initiation interne dirigée par l'IRES du cardiovirus n'est pas touchée. Ainsi si un élément IRES existe dans le leader 5' REV-A, la présence de la protéase L ne devrait pas affecter l'expression du cistron dont la traduction est sous sa dépendance. Dans ce cas, les essais mettent en oeuvre le système RRL Flexi (Promega) à 50 % de sa concentration initiale, 8 μg/ml d'ARN,1 mCi de [^{35}S] méthionine par ml (Amersham) et 30 ng de protéase L recombinante et purifiée par les méthodes conventionnelles. Le mélange réactionnel est supplémenté par du chlorure de potassium à une concentration finale de 80 mM. La réaction est poursuivie à 31°C pendant 1 h.

Les échantillons sont dénaturés par la chaleur dans 62,5 mM de Tris-HCl pH6,8, 2 % de sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 % de glycérol, 5 % de β-mercaptoéthanol et 0,02 % de bleu de bromophénol et les protéines marquées analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % (poids/vol), 0,2 % SDS. Le produit du gène neo et la β-galactosidase migrent à une masse moléculaire d'environ 28 et 46 kDa respectivement. L'efficacité de la traduction coiffe-dépendante et indépendante est quantifiée par scanographie (Phospho-Imageur Storm 840, version 4.00, Molecular Dynamics ; Image Quant ™ version 1.1, Molecular Dynamics). Dans le cas des vecteurs dicistroniques, l'intensité du marquage du produit d'expression du second cistron (β-galactosidase) dont la traduction est médiée par l'IRES est évaluée après

standardisation du niveau d'expression du produit neo.

On observe que la traduction des ARN non coiffés obtenus à partir des plasmides monocistroniques pREV CB-95, pREV CG-53, pREV CG-54, pREV CG-55 et pREV CG-56 est aussi efficace que celle des ARN coiffés. Cependant, comme attendu, la quantité de β-galactosidase générée à partir du plasmide pREV CG-53 dans lequel les séquences REV-A (1 à 578) sont en orientation antisens est beaucoup plus faible que celle obtenue avec les constructions utilisant une séquence REV-A dans l'orientation sens. Lorsque les fragments REV-A sont mis en oeuvre d'une manière dicistronique entre les gènes neo et LacZ, l'expression de la β-galactosidase n'apparaît qu'en présence d'un IRES fonctionnel (pREV CB-54, pREV CB-55, et pREV CG-52) alors que celle du premier cistron (neo) est efficace dans tous les cas (y compris pREV CG-50). Des essais compatifs de traduction *in vitro* menés avec les vecteurs précédents et le plasmide pEMCV-D260-837 comprenant l'IRES EMCV de référence montrent que les fragments REV-A 1-578, 265-578 et 452-578 sont capables d'initier la traduction du second cistron d'une manière plus efficace que celle dirigée par l'IRES EMCV. Par ailleurs, le traitement des lysats de réticulocytes par la protéase L s'accompagne d'une inhibition de l'expression coiffe-dépendante du gène neo alors que l'expression de la β-galactosidase dépendante de l'IRES est sensiblement augmentée. Pour le témoin pREV CG-50, on observe également l'inhibition de l'expression neo alors que l'expression de la β-galactosidase est à peine détectable que le traitement à la protéase L ait lieu ou non. A titre indicatif, l'effet de la protéase sur l'expression des deux gènes rapporteurs est illustré ci-après.

Tableau 1 : Rapport de l'expression des gènes en présence et en absence de protéase L de FMDV.

Construction	neo	LacZ
pREV CG-50	- 51,85	- 5,53
pREV CB-54	- 55,36	+ 40,24
pREV CB-55	- 34,65	+ 84,42
pREV CG-58	- 45,07	+ 57,51
pEMCV-D260-837	- 79,51	+ 33,93

EXEMPLE 2 : Vecteurs rétroviraux comprenant une séquence IRES REV-A

On a construit une série de vecteurs rétroviraux utilisant les séquences REV-A à titre de sites IRES ou d'éléments augmentant l'encapsidation. La Figure 3 illustre les vecteurs de la série pREV HW possédant des LTRs de type MoMLV et les vecteurs témoins utilisés dans les expériences décrites ci-après. Bien que ceux-ci ne soient pas représentés, on a également construit des vecteurs désignés pMC qui diffèrent des pREV HW uniquement par le fait que leurs LTRs sont d'origine SNV et des contrôles négatifs dans lesquels les séquences REV-A sont positionnées en orientation reverse (3' -> 5') par rapport aux LTRs. Pour toutes les étapes de biologie moléculaire, ces vecteurs sont introduits dans le plasmide pBR322.

1. Construction des vecteurs rétroviraux.

Le vecteur témoin pEMCV-CBTV (pBC100) est un vecteur dicistronique comprenant, outre les LTRs et la région d'encapsidation dérivés de MoMLV, le gène codant pour la phosphatase alcaline placentaire (plap) dont la traduction est coiffe-dépendante et le gène neo dont la traduction est dépendante du site IRES EMCV (Torrent et al., 1996, Human Gene Therapy 7, 603-611).

Les vecteurs pREV HW ont été obtenus de la façon suivante :

pREV HW-1 : le fragment REV-A s'étendant des nt 265 à 578 généré par PCR

et digéré par *Nhe*I est cloné entre les gènes plap et neo de pMLV-CB71 (Berlioz et Darlix, 1995, J. Virol. *69*, 2214-2222).

pREV HW-2 : le fragment *Eco*RI de pVL CBT5 (Torrent et al., 1996, Human Gene Therapy *7*, 603-611) portant le LTR 5' MoMLV et les séquences d'encapsidation de VL30 est introduit dans le vecteur pREV HW-1 linéarisé par *Eco*RI.

pREV HW-3 : le fragment *Eco*RI de pEMCV-CBTV contenant le LTR 5' et les séquences d'encapsidation de MoMLV est inséré dans le vecteur pREV HW-1 linéarisé par *Eco*RI.

pREV HW-4 : le fragment REV-A s'étendant des nt 452 à 578 généré par PCR et digéré par *Nhe*I est cloné entre les gènes plap et neo de pMLV-CB71.

pREV HW-5 : le fragment *Eco*RI de pVL CBT5 portant le LTR 5' MoMLV et les séquences d'encapsidation de VL30 est introduit dans le vecteur pREV HW-4 linéarisé par *Eco*RI.

pREV HW-6 : le fragment *Eco*RI de pEMCV-CBTV contenant le LTR 5' et les séquences d'encapsidation de MoMLV est inséré dans le vecteur pREV HW-4 linéarisé par *Eco*RI.

Les vecteurs de la série pMC sont obtenus selon le schéma de construction suivant : Les LTRs SNV sont générés par PCR à partir du plasmide REV-A 2-20-6 (O'Rear et Temin, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79*, 1230-1234 ; Darlix et al., 1992, J. Virol. *66,* 7245-7252). Le gène neo est isolé de pMLV-CB71 par digestion avec *Sal*I et *Bam*HI puis introduit entre les mêmes sites du vecteur pUC19 (Gibco BRL). Le LTR 5' du SNV (nt 1 à 861) est digéré par *Hin*dIII et *Sal*I, et inséré dans pUC19-neo préalablement clivé par ces mêmes enzymes. Le LTR 3' SNV (nt 7230-8300) digéré par *Sma*I et *Eco*RI est cloné dans le vecteur précédent pour donner pCG-61 contenant LTR 5' SNV-neo-LTR 3' SNV. En parallèle, on génère un vecteur désigné pCG-62 qui diffère du précédent par la délétion des séquences env (nt 7230-7691) obtenu par traitement *Bgl*II-*Avr*II, Klenow et religation. Le gène plap isolé du clone Cla-12AP (DGoff)

est introduit entre les sites *Eco*RI et *Xba*I d'un plasmide bluescript préalablement délété du site *Sal*I (digestion *Eco*RI-*Xho*I) avant d'être réisolé sous la forme d'un fragment *Kpn*I-*Sal*I et cloné entre les mêmes sites de pCG-61 et pCG-62, pour donner pCG-63 et pCG-64 respectivement. Le gène LacZ est obtenu par digestion partielle de pREV CB-95 par les enzymes *Sal*I et *Bam*HI. Son insertion entre les sites *Sal*I et *Bam*HI de pCG-61 et pCG-62 donne lieu à pCG-65 et pCG-66 respectivement. Enfin, le bloc LTR-Gene-LTR est isolé de chaque plasmide pCG-62, pCG-64 et pCG-66 par digestion *Hin*dIII-*Eco*RI pour être inséré dans le vecteur pBR322 clivé par ces mêmes enzymes. On génère pMC1, pMC2 et pMC3.

2. Génération de particules virales infectieuses et détermination du titre viral et de l'expression des gènes reporteurs plap et neo.

La lignée de complémentation écotrope GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., *62*, 1120-1124) et les cellules cibles NIH3T3 (cellules fibroblastiques de souris) disponibles à l'ATCC, sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO_2 dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) complémenté avec 10% de sérum de veau de nouveau-né. Les cellules helper GP+E-86 et les cellules cibles NIH3T3 sont mises en culture la veille de la transfection et de l'infection. Les infections virales sont réalisées selon le protocole conventionnel décrit dans la littérature.

20 µg de vecteurs pREV HW-1 à 6 ainsi que de vecteur de référence pEMCV-CBTV sont transfectés en parallèle dans les cellules GP+E-86 ($5x10^5$ cellules par boîte de 10cm) selon la méthode de Chen et Okyama (1987, Mol. Cell. Biol., *7*, 2745-2753 ; 1988, Bio/Techniques *6*, 632-637). Différentes dilutions de surnageants des cultures GP+E-86 stables ou transitoires sont utilisées pour infecter les cellules cibles NIH3T3 ensemencées la veille de l'infection à raison de $2x10^4$ cellules par puits. Au préalable, les surnageants viraux ont été filtrés (sur filtres de 0,45 µm) et mis en présence de polybrène à

une concentration finale de 8 μg/ml. L'infection est pousuivie toute la nuit à 37°C et le jour suivant, les cellules sont lavées et cultivées dans du milieu frais. Après 48 h, les cellules sont placées en milieu sélectif (1 mg/ml de G418) ou colorées pour déterminer le nombre de cellules exprimant la phosphatase alcaline plap. On procède tout d'abord à une fixation dans du tampon PBSx1 contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après deux rinçages dans du PBSx1 suivis d'une incubation de 30 min à 65°C dans du PBSx1, les cellules sont lavées à deux reprises dans du tampon AP (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$ dans du PBSx1) et placées 5 h dans la solution de coloration (0,1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), 1 mg/ml d'un sel de térazolium de Nitroblue (NBT) et 1 mM de Levamisol dans du tampon AP). Ces expériences de coloration histochimique confirment l'expression de la phosphatase alcaline dans les cellules helper GP+E-86 et dans les cellules cibles NIH3T3.

Le titre des virus recombinants est déterminé après transfection des cellules écotropes GP+E-86. Après deux jours d'incubation, le surnageant viral est récolté et utilisé pour déterminer le titre viral (expression transitoire). Ensuite, les cellules transfectées sont sélectionnées au G418 pendant un mois. Après cette sélection, on détermine le titre viral sur le surnageant récolté (expression stable). Celui-ci correspond au nombre de particules infectieuses par ml de surnageant. Par la méthode des dilutions limites, les cellules cibles NIH3T3 sont infectées avec des dilutions en série de surnageant viral et, après deux jours d'incubation, les cellules sont colorées histochimiquement et comptées. Les résultats suivants sont obtenus (Tableau 2):

Vecteur	Expression transitoire (cfu/ml)	Expression stable (cfu/ml)
pREV HW-1	-	-
pREV HW-2	$0,2x10^4$	$3,2x10^6$
pREV HW-3	$1,6x10^4$	$1,4x10^9$
pREV HW-4	-	-
pREV HW-5	$1,3x10^4$	$6,5x10^5$
pREV HW-6	$2,0x10^4$	$4,5x10^8$
pEMCV-CBTV	$1,1x10^4$	$2,1x10^8$

Les vecteurs pREV HW-1 et pREV HW-4 dépourvus de région d'encapsidation conventionnelle sont incapables de produire des particules virales infectieuses après transfection dans la lignée helper MLV (GP+E-86). Cependant, on indique que le vecteur pMC1 peut être encapsidé dans des particules virales SNV après transfection de la lignée helper SNV D17-C3A2 (par exemple ATCC CRL8468), indiquant que les séquences REV-A s'étendant des nt 265 à 578 peuvent être utilisées dans ce contexte à titre de région d'encapsidation. Les vecteurs rétroviraux comprenant à la fois une séquence REV-A (265-578 ou 452-578) et une région d'encapsidation conventionnelle produisent des particules virales à un titre élevé (pREV HW-2, 3, 5 et 6). Cependant l'association avec la région d'encapsidation de MLV s'avère particulièrement avantageuse puisqu'elle donne des titres viraux 2 (pREV HW-6) à 5 fois (pREV HW-3) plus élevés que le vecteur de référence pEMCV-CBTV combinant cette même région d'encapsidation et l'IRES EMCV. De plus, la comparaison des données obtenues avec les vecteurs identiques variant uniquement au niveau du segment REV-A mis en oeuvre (pREV HW-2 et pREV HW-5 ou pREV HW-3 et pREV HW-6) laisse supposer que la séquence allant des nt 265 à 578 est capable de coopérer avec la région d'encapsidation et ainsi améliorer l'encapsidation des ARN viraux et en conséquence les titres viraux. Un élément interagissant d'une manière positive avec l'encapsidation pourrait être

présent entre les nt 452 et 265 dans le génome REV-A.

3. Analyse des virus recombinants par microscopie électronique.

La morphologie des virions recombinants pREV HW produits après transfection de la lignée GP+E-86 par les vecteurs correspondants est analysée par microcopie électronique. On utilise à titre de témoins les virus obtenus de pEMCV-CBTV dans les mêmes conditions et les rétrovirus sauvages obtenus après infection des cellules NIH3T3 avec la souche FMLV-29 (Friend murine leukemia virus souche 29). Les résultats de microscopie indiquent que le contenu en ARN n'affecte pas la morphologie des virus recombinants.

4. Effet de la rapamycine sur l'expression des cistrons plap et neo.

Les cellules GP+E-86 sont transfectées d'une manière stable par 20 μg de vecteurs de la série pREV HW ou pEMCV-CBTV et cultivées en conditions sélectives (G418) pendant 15 jours. A 70 à 80 % de confluence, elles sont mises en présence de rapamycine à une concentration finale de 20 ng/ml. Cette dernière a un effet inhibiteur sur la traduction coiffe-dépendante variant de 15 à 40 % selon la lignée cellulaire (Beretta et al., 1996, EMBO J. *15*, 658-664) mais n'affecte pas la traduction cap-indépendante. Les extraits cellulaires sont préparés classiquement après 20 h d'incubation. Brièvement, les cellules sont lavées deux fois dans du PBSx1, placées dans 1 ml de TEN (40 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) pour une boîte de 10 cm puis récupérées par grattage et centrifugées à faible vitesse. Le culot est repris dans 100 μl de Tris-HCl 0,25 M, pH8 et soumis à une lyse cellulaire par 3 cycles de congélation-décongélation. Après centrifugation 10 min à 14000 g, le surnageant est récupéré et peut être conservé à -70°C en attendant de procéder aux tests enzymatiques. La concentration finale en protéine est déterminée par le test Micro BCA (Pierce). L'activité enzymatique plap des extraits cellulaires est évaluée spectrophotométriquement (kit alcaline phosphatase, BIORAD). Les

unités plap sont déterminées par rapport à un standard constitué par la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim). Les activités neo sont mesurées par le transfert de phosphate marqué au [γ-^{32}P]sur la neomycine (Ramesh et Osborne, 1991, Anal. Biochem. *193*, 316-318). Les résultats de l'expression des gènes plap et neo mesurés en absence et en présence de rapamycine sont illustrés à la Figure 4 et présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : effet de la rapamycine sur l'expression des cistrons plap et neo exprimé en % par rapport aux cellules non traitées.

Lignée cellulaire	phosphatase alcaline	Neomycine phosphotransférase
GP+E-86	-	-
pREV HW-1	-40,9	+21,5
pREV HW-2	+21,3	+26,7
pREV HW-3	+34,8	-6,5
pREV HW-4	-94,6	+3,0
pREV HW-5	+66,7	+46,9
pREV HW-6	+46,1	+49,6
pEMCV-CBTV	-2,6	+20,5

Dans les vecteurs pREV HW-1 et pREV HW-4, la présence de rapamycine réduit la traduction cap-dépendante et augmente celle dépendante de l'IRES. Cette stimulation peut s'expliquer par une moindre compétition pour la machinerie traductionnelle en présence de rapamycine. Lorsque deux éléments IRES sont présents, l'addition de rapamycine s'accompagne d'une augmentation de l'expression des deux gènes. Cependant, les données quantitatives d'expression indiquent que l'activité relative des IRES est différente, ce qui suggère une compétiton entre eux pour les ribosomes.

En résumé, l'ensemble des données montrent la présence d'un site IRES

efficace dans le leader 5' des ARN du virus REV-A et, probablement d'un élément interagissant de manière positive avec l'encapsidation. L'élément IRES minimum est contenu au sein d'une séquence de 129 nt (positions 452 à 578).

EXEMPLE 3 : Transduction de cellules neuroectodermales humaines pluripotentes

Cette étude est réalisée dans la lignée cellulaire humaine Dev qui constitue un modèle cellulaire du système nerveux central, cible potentielle pour la thérapie génique humaine. Les cellules Dev dérivent d'une tumeur primaire humaine d'origine neuroectodermale (PNET) et se comportent comme des cellules souches pluripotentes (Derrington et al., 1997, Oncogene, sous presse). De plus, il est possible d'induire leur différenciation soit en neurones soit en cellules gliales (Derrington et al., 1997, *supra* ; Dufay et al., 1994, Eur. J. Neurosci. *6*, 1633-1640 ; Giraudon et al., 1993, Neurosci. *52*, 1069-1079). Dans cette étude, le vecteur dicistronique pREV HW-3 (IRES REV-A 265-578) est comparé au vecteur contrôle pEMCV CBTV (IRES EMCV).

Les cellules Dev sont infectées avec une dilution au 1/100 de surnageant viral pendant 2 jours puis fixées, colorées histochimiquement selon le protocole ci-dessus et comptées. Le titre viral est similaire pour les deux vecteurs et de l'ordre de $3x10^3$ TU/ml. Les unités de transduction (TU/ml) correspondent au rapport du nombre de colonies x dilution du rétrovirus infectant par le volume total (ml) du vecteur dilué placé sur les cellules.

On vérifie également l'expression des deux cistrons neo et plap. Pour ce faire, les cellules cibles sont comme précédemment transduites avec une dilution 1/100 de surnageant viral et sélectionnées en présence de G418 pendant 3 semaines. On détermine l'intensité de la fluorescence par cytométrie de flux avec un anticorps spécifique pour la plap (DAKO). On indique qu'un anticorps polyclonal convient. Les résultats montrent la production de l'enzyme plap par les

cellules transduites et sélectionnées au G418. En parallèle, la synthèse de l'enzyme plap est confirmée par coloration histochimique des clones résistants.

Ces données montrent que le vecteur dicistronique pREV HW-3 peut transduire de façon efficace des cellules humaines dérivées du système nerveux central et y transférer des gènes d'intérêt et confirment la fonctionnalité du site IRES REV-A pour médier la production du produit d'expression du second cistron.

Par ailleurs, différents protocoles de transduction ont été étudiés dans un but d'optimisation. Les variantes sont les conditions de culture des cellules en présence ou en absence de sérum et en présence ou en absence de facteurs de croissance (FGF-2) et la production des virus en présence ou en absence de sérum. Les six protocoles suivants ont été comparés avec les virus pEMCV CBTV et pREV HW-3 possédant l'enveloppe polytrope GaLV (production sur cellules PG13, ATCC CRL-10686).

Protocole 1 : cellules cultivées en milieu avec sérum (10 %), virus produit en présence de sérum (10 %).

Protocole 2 : cellules cultivées en milieu avec sérum (10 %), virus produit en absence de sérum.

Protocole 3 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en présence de sérum (10 %).

Protocole 4 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en absence de sérum.

Protocole 5 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en présence de sérum (10 %), présence de FGF-2.

Protocole 6 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en absence de sérum, présence de FGF-2.

Le pourcentage de cellules Dev transduites est déterminé par cytométrie de flux (Figure 5). Le pourcentage de cellules transduites par pREV HW-3 dépasse 30% lorsque la culture des cellules Dev est effectuée en absence de sérum.

Un tel % n'est pas atteint avec le virus conventionnel pEMCV CBTV. L'ajout de facteurs de croissance est également avantageux. Parmi tous les protocoles mis en oeuvre, le protocole 5 permet de transduire plus de 50 % de cellules Dev. Ces résultats montrent que les vecteurs polycistroniques de l'invention portant l'IRES REV-A sont fonctionnels pour transduire les cellules neuroectodermales pluripotentes. Le développement de protocoles pour la transduction efficace de lignées cellulaires humaines est un point essentiel dans l'élaboration des stratégies de transfert de gènes.

L'expression des cistrons plap et neo est évaluée après différenciation neuronale et gliale (Derrington et al., 1997, *supra*). Brièvement, les cellules Dev adoptent un phénotype différencié en présence de sérum et de FGF-2 alors que lorsque la culture est réalisée en absence de sérum, le phénotype est pluripotent. Les résultats d'immunofluorescence avec un anticorps spécifique anti-plap sur cellules Dev transduites, sélectionnées au G418 et différenciées montrent une expression de la plap dans les cellules neuronales et gliales. Ces données suggèrent que l'état de différenciation n'inhibe pas la traduction médiée par l'IRES REV-A.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:
(A) NOM: INSERM
(B) RUE: 101 rue de Tolbiac
(C) VILLE: Paris cedex 13
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 75654
(G) TELEPHONE: 01 44 23 60 00
(H) TELECOPIE: 01 45 85 68 56

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau site interne d'entree des ribosomes et vecteur le contenant.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

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

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 940 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ARN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Reticuloendotheliosis virus
(B) SOUCHE: type A (REV-A)
(C) INDIVIDUEL ISOLE: leader 5' de l'ARN genomique REV-A

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

AAUGUGGGAG GGAGCUCCGG GGGGAAUAGC GCUGGCUCGC UAACUGCCAU AUUAGCUUCU 60

GUAAUCAUGC UUGCUUGCCU UAGCCGCCAU UGUACUUGAU AUAUUUCGCU GAUAUCAUUU 120

CUCGGAAUCG GCAUCAUUUC UCGGAAUCGG CAUCAAGAGC AGGCUCAUAG ACCAUAAAAG 180

GAAAUGUUCG UUGGAGGCGA GCAUCAGACC ACUUGCGCCA UCCAAUCACG AGCAAACACG 240

AGAUCGAACU AUCAUACUGA GCCAAUGGUU GUAAAGGGCA GAUGCUAUCC UCCAAUGAGG 300

GAAAAUGUCA UGCAACAUCC UGUCCUGUAA GCGGCUAUAU AAGCCAGGUG CAUCUCUUGC 360

UCGGGGUCGC CGUCCUACAC AUUGUUGUGA CGCGCGGCCC AGAUUCGAAU CUGUAAUAAA 420

AGUUUUUUUC UUCUAUAUCC UCAGAUUGGC AGUGAGAGGA GAUUUUGUUC GUGGUGUAGG 480

CUGGCCUACU GGGUGGGGUA GGGGUCCGGA CUGAAUCCGU AGUAUUUCGA UACAACAUUU 540

GGGGGCUCGU CCGGGAUUCC UCCCCAUCGG CAGAAGUGCC UACUGUUUCU UCGAACUCCG 600

GCGCCGGUAA GUAAGUACUU GAUUUUGGUA CCUCGCGAGG GUUUGGGAGG AUCGGAGUGG 660

CGGGACGCUG CCGGGAAGCU CCACCUCCGC UCAGCAGGGG ACGCCCUGAU CUGAGCUCUG 720

UGGUAUCUGA UUGUUGUUGG ACCGUCUCCA AGACGGUGAU AAUAUAAGUC GUGGUUUGUG 780

UGUUUGUUUG UUACCUUGUG UUUGUUCGUC ACUUGUCGAC AGCGCCCUGC GAAUUGGUGU 840

GCCCACACCG CGCGGCUUGC GAAUAAUACU UUGGAGAGUC UUUUGCCUCC AGUGUCUUCC 900

GUUUGUACUC GUCCUCCUCU CCCUCUCCGG CCGGGAUGGG 940

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 578 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ARN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Reticuloendotheliosis virus
(B) SOUCHE: type A (REV-A)

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

GGGGUCGCCG UCCUACACAU UGUUGUGACG CGCGGCCCAG AUUCGAAUCU GUAAUAAAAG 60

UUUUUUUCUU CUAUAUCCUC AGAUUGGCAG UGAGAGGAGA UUUUGUUCGU GGUGUAGGCU 120

GGCCUACUGG GUGGGGUAGG GGUCCGGACU GAAUCCGUAG UAUUUCGAUA CAACAUUUGG 180

GGGCUCGUCC GGGAUUCCUC CCCAUCGGCA GAAGUGCCUA CUGUUUCUUC GAACUCCGGC 240

GCCGGUAAGU AAGUACUUGA UUUUGGUACC UCGCGAGGGU UUGGGAGGAU CGGAGUGGCG 300

GGACGCUGCC GGGAAGCUCC ACCUCCGCUC AGCAGGGGAC GCCCUGAUCU GAGCUCUGUG 360

GUAUCUGAUU GUUGUUGGAC CGUCUCCAAG ACGGUGAUAA UAUAAGUCGU GGUUUGUGUG 420

UUUGUUUGUU ACCUUGUGUU UGUUCGUCAC UUGUCGACAG CGCCCUGCGA AUUGGUGUGC 480

CCACACCGCG CGGCUUGCGA AUAAUACUUU GGAGAGUCUU UUGCCUCCAG UGUCUUCCGU 540

UUGUACUCGU CCUCCUCUCC CUCUCCGGCC GGGAUGGG 578

Revendications

1. Utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV), à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) dans un vecteur et/ou pour permettre ou améliorer l'encapsidation d'un vecteur rétroviral.

2. Utilisation selon la revendication 1, selon laquelle le rétrovirus de type C est sélectionné parmi les virus REV, MSV, MHV, MEV, FMOV, AMLV, MEELV, SFFV, RASV, FLV, FSV, EFLV, SSV, GALV et BAEV.

3. Utilisation selon la revendication 2, selon laquelle ladite séquence nucléotidique dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendotéliose.

4. Utilisation selon la revendication 3, selon laquelle ladite séquence nucléotidique dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendotéliose aviaire et, notamment de type A.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est substantiellement homologue ou identique à tout ou partie de la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1.

6. Utilisation selon la revendication 5, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

(i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,

(ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou

(iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

7. Utilisation selon la revendication 6, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

(i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,

(ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou

(iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

8. Vecteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt comprenant ladite séquence nucléotidique en usage selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique ou d'un vecteur viral dérivé d'un virus sélectionné parmi le groupe des poxvirus, adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus et rétrovirus.

10. Vecteur selon la revendication 8 ou 9, dérivant d'un rétrovirus et comprenant au moins les éléments suivants associés d'une manière fonctionnelle : un LTR 5' et un LTR 3' rétroviraux, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et ladite séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 7 pour permettre ou améliorer l'encapsidation dudit vecteur dans une particule virale et/ou à titre de site IRES pour permettre ou améliorer l'expression d'un gène d'intérêt positionné en aval de ladite séquence nucléotidique.

11. Vecteur rétroviral selon la revendication 10, dans lequel ladite séquence nucléotidique est à titre de site IRES et comprenant en outre une région d'encapsidation hétérologue à ladite séquence nucléotidique.

12. Vecteur rétroviral selon la revendication 10 ou 11, comprenant au moins :

(a) un LTR 5' rétroviral,

(b) une région d'encapsidation,

(c) de manière optionnelle, un premier gène d'intérêt suivi d'une région promotrice interne une origine différente de celle dudit LTR 5' rétroviral,

(d) un second gène d'intérêt,

(e) un site IRES,,

(f) un troisième gène d'intérêt, et

(g) un LTR 3' rétroviral,

l'un au moins de la région d'encapsidation et du site IRES étant constitué par ladite séquence nucléotidique en usage selon l'une des revendications 1 à 7.

13. Vecteur rétroviral selon la revendication 12, dans lequel la région promotrice interne, le second gène d'intérêt, le site IRES et le troisième gène d'intérêt sont dans une orientation inverse par rapport aux LTRs 5' et 3' rétroviraux.

14. Vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13, dans lequel la région d'encapsidation dérive d'un rétrovirus murin, notamment d'un MoMLV, ou d'un rétrotransposon de type VL30 et le site IRES comprend une séquence nucléotidique telle que définie à la revendication 6.

15. Vecteur rétroviral selon la revendication 14, dans lequel la région

d'encapsidation dérive d'un MoMLV et le site IRES comprend une séquence nucléotidique identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578 ou commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

16. Vecteur rétroviral selon la revendication 10, comprenant un LTR 5' rétroviral dérivé d'un virus REV, notamment SNV, un LTR 3' rétroviral d'une origine quelconque, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578, ou commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, à titre de région d'encapsidation.

17. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, comprenant un gène d'intérêt codant pour un produit d'expression sélectionné parmi le facteur VIII, le facteur IX, la protéine CFTR, la dystrophine, l'insuline, l'interféron alpha, béta, gamma, une interleukine (IL) notamment l'IL-2 et un marqueur de sélection.

18. Une particule virale générée à partir d'un vecteur viral selon l'une des revendications 8 à 17.

19. Une cellule comprenant un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17 ou infectée par une particule virale selon la revendication 18.

20. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une cellule selon la revendication 19

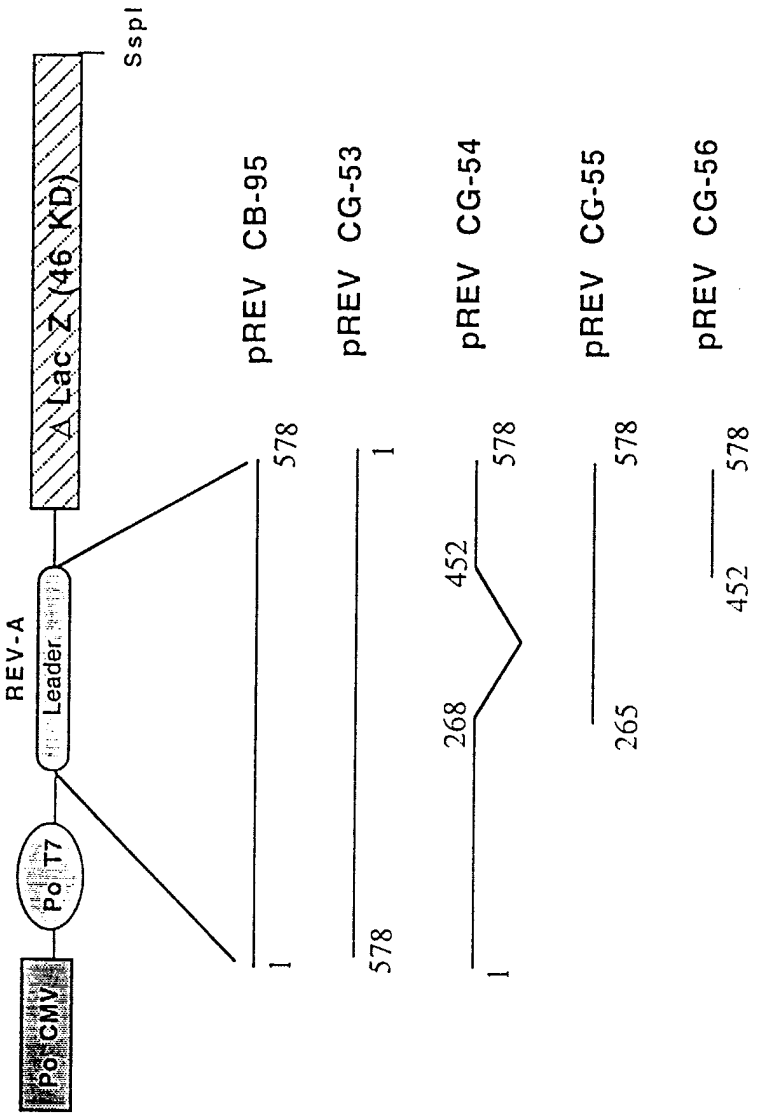
pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique.

21. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une cellule selon la revendication 19 pour la préparation d'un ou plusieurs polypeptides d'intérêt par voie recombinante ou pour la production d'un animal transgénique.

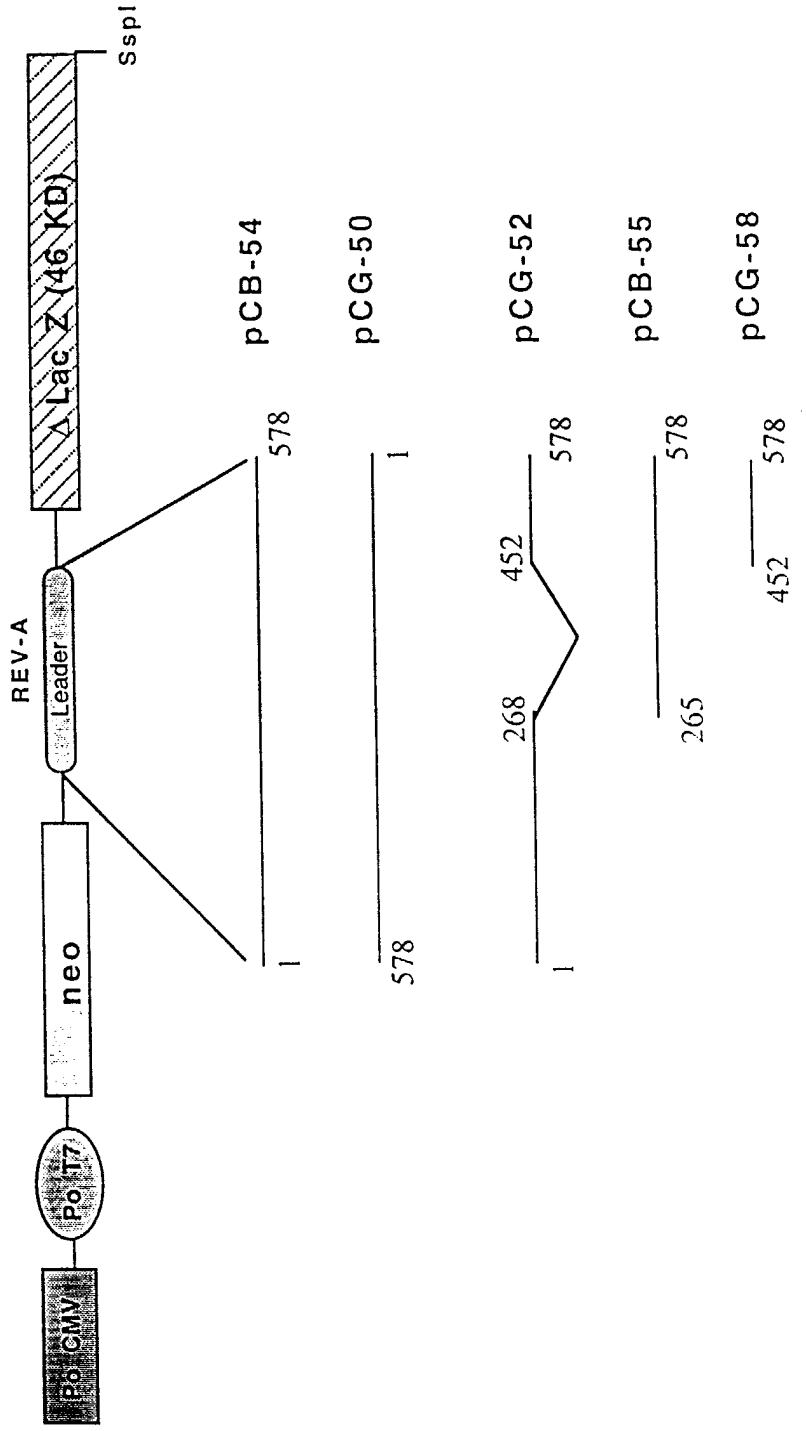
22. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, une particule virale selon la revendication 18, une cellule selon la revendication 19 ou un polypeptide d'intérêt obtenu selon l'utilisation selon la revendication 21, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

23. Une composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence entre 10^6 et 10^{11} pfu particules virales selon la revendication 18.

24. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 22 ou 23, pour la transfection ou l'infection de cellules pluripotentes, notamment de cellules pluripotentes du système nerveux central.

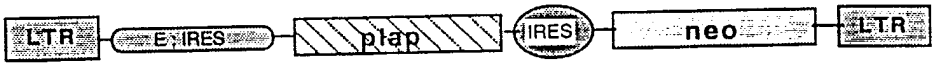

Sspl
Δ Lac Z (46 KD)
REV-A
Leader
Po T7
Po CMV
pREV CB-95
pREV CG-53
pREV CG-54
pREV CG-55
pREV CG-56
1
578
578
1
1
268
452
578
1
265
578
452
578

- Figure 1 -

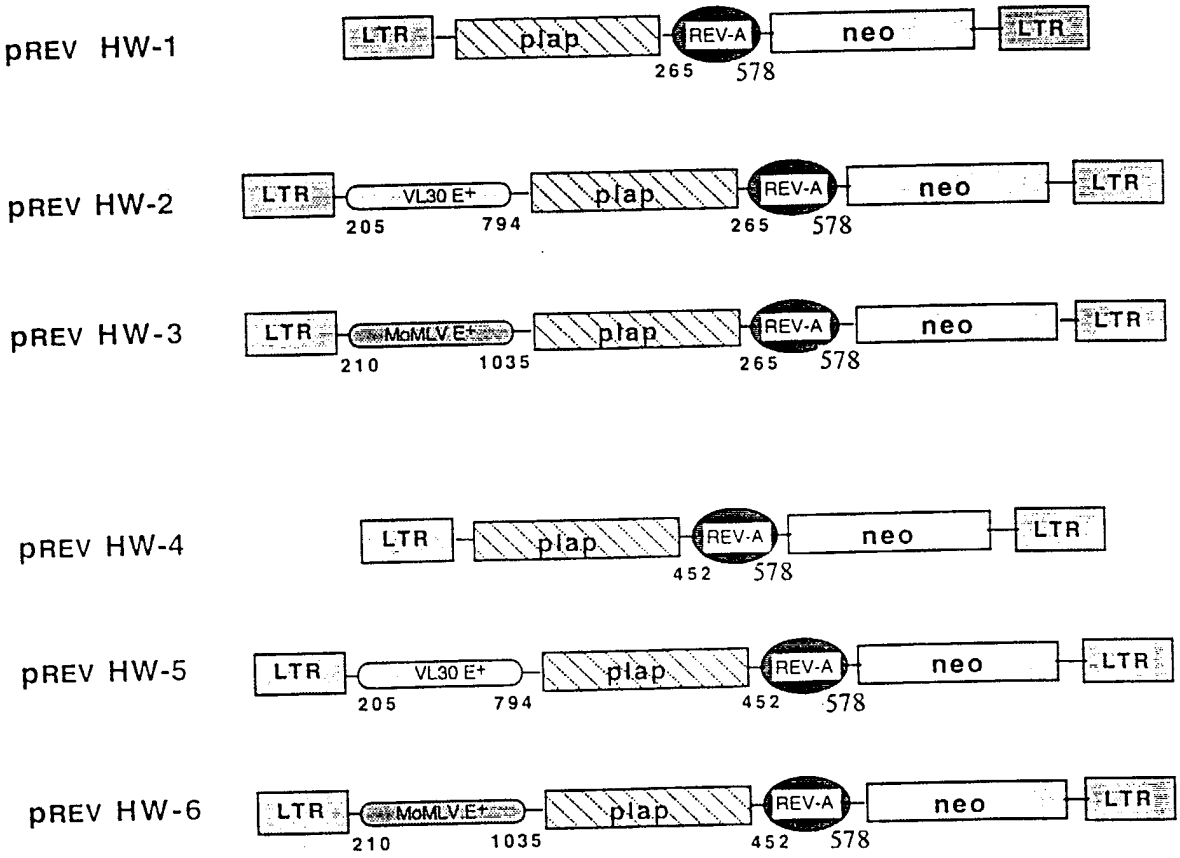

Pro CMV
Pro T7
neo
REV-A
Leader
ΔLac Z (46 KD)
SspI
pCB-54
pCG-50
pCG-52
pCB-55
pCG-58
1
578
268
452
265

- Figure 2 -

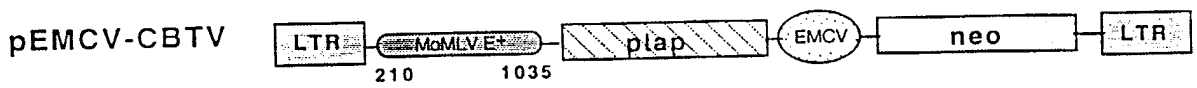
A) Structure générale des vecteurs rétroviraux



B) Nouveaux vecteurs rétroviraux dicistroniques.

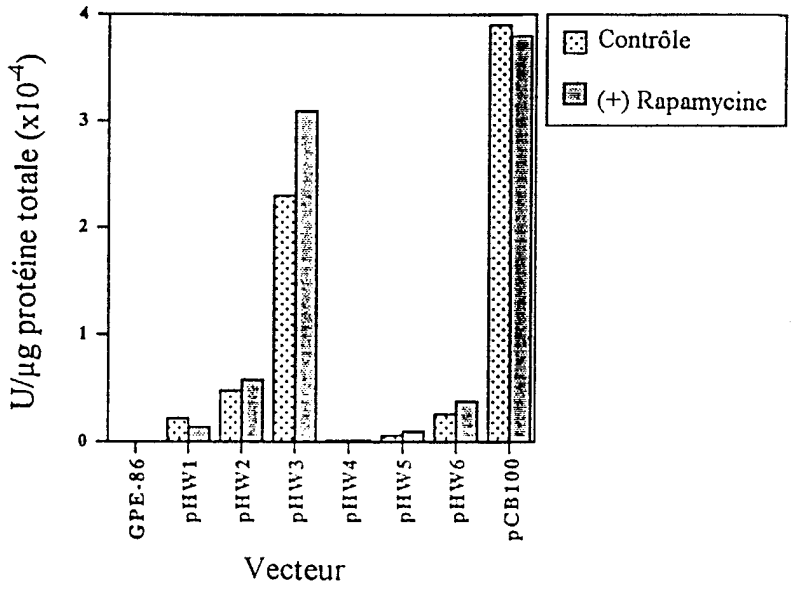


C) Vecteur de Contrôle

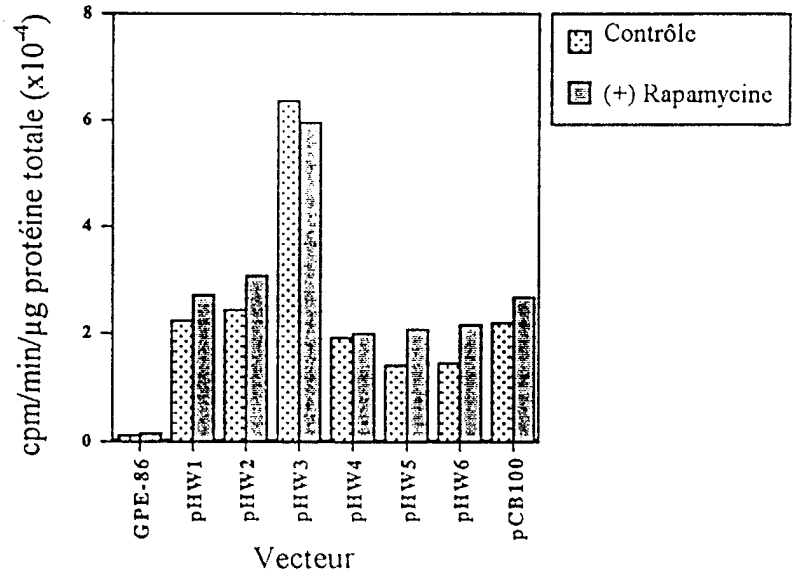


- Figure 3 -

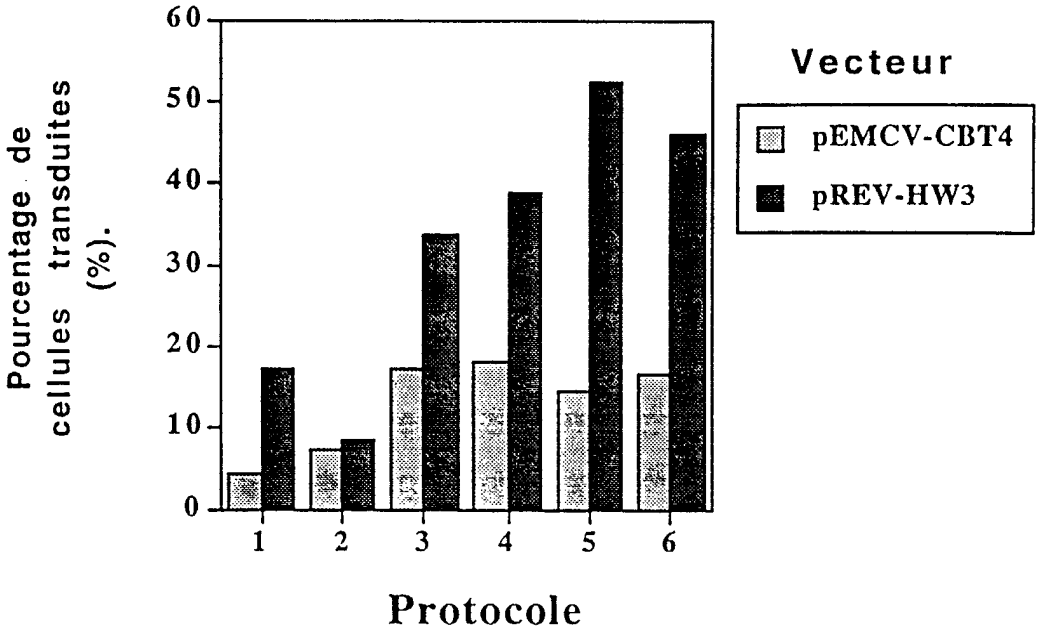
A) Effet de la ripamycine sur l'activité phosphatase alcaline



B) Effet de la ripamycine sur l'activité neomycine phosphotransférase



- Figure 4 -


Pourcentage de cellules transduites (%).
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
Protocole
Vecteur
pEMCV-CBT4
pREV-HW3

- Figure 5 -

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ational Application No
PCT/FR 98/00849

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N15/11 //C12N15/67

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 6 C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 96 01324 A (INSERM) 18 January 1996 see the whole document ---	1,2, 8-11, 17-22 3-7, 12-15
X	WO 94 05786 A (BEIERSDORF AG) 17 March 1994 see abstract see page 5, line 9 - page 6, line 7 see page 9, line 29 - page 15, line 13 see claims 1-18 ---	1,2,8, 17-22
X	WO 94 05785 A (BEIERSDORF AG) 17 March 1994 see abstract see page 9, line 29 - page 22, line 20 --- -/--	1,2,8, 17-22

[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
1 September 1998	15/09/1998

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	Panzica, G

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir. ational Application No
PCT/FR 98/00849

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 03143 A (ANDERSON W. ET AL.) 18 February 1993 cited in the application see abstract see page 1 - page 3 see page 5 - page 9 * revendications *	1-23
A	US 5 112 767 A (ROY-BURMAN PRADIP ET AL.) 12 May 1992	13
A	WO 93 05815 A (FILLER AARON GERSHON ;LEVER ANDREW M L (GB)) 1 April 1993	24
A	WO 96 15813 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER; QUESENBERRY PETER J. (US)) 30 May 1996	24

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ir ational Application No
PCT/FR 98/00849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9601324 A	18-01-1996	FR 2722208 A	12-01-1996
		AU 2929595 A	25-01-1996
		CA 2194155 A	18-01-1996
		EP 0769062 A	23-04-1997
		JP 10503644 T	07-04-1998
WO 9405786 A	17-03-1994	DE 4228457 A	28-04-1994
		AU 4953893 A	29-03-1994
		EP 0658199 A	21-06-1995
		JP 8502884 T	02-04-1996
		US 5665567 A	09-09-1997
WO 9405785 A	17-03-1994	DE 4228458 A	01-06-1994
		AU 4953793 A	29-03-1994
		EP 0658198 A	21-06-1995
		JP 8502644 T	26-03-1996
WO 9303143 A	18-02-1993	CA 2114416 A	18-02-1993
		EP 0598029 A	25-05-1994
		JP 6509713 T	02-11-1994
US 5112767 A	12-05-1992	NONE	
WO 9305815 A	01-04-1993	AU 669128 B	30-05-1996
		AU 2567992 A	27-04-1993
		CA 2119145 A	01-04-1993
		EP 0610232 A	17-08-1994
		EP 0640350 A	01-03-1995
		JP 7501793 T	23-02-1995
WO 9615813 A	30-05-1996	US 5665350 A	09-09-1997
		AU 4378996 A	17-06-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de internationale No
PCT/FR 98/00849

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N15/11 //C12N15/67

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 6 C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 01324 A (INSERM) 18 janvier 1996	1,2, 8-11, 17-22
A	voir le document en entier	3-7, 12-15

X	WO 94 05786 A (BEIERSDORF AG) 17 mars 1994	1,2,8, 17-22
	voir abrégé voir page 5, ligne 9 - page 6, ligne 7 voir page 9, ligne 29 - page 15, ligne 13 voir revendications 1-18	

X	WO 94 05785 A (BEIERSDORF AG) 17 mars 1994	1,2,8, 17-22
	voir abrégé voir page 9, ligne 29 - page 22, ligne 20	

	-/--	

[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 revendcation de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

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

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

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

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

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

"&" 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
1 septembre 1998	15/09/1998

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	Panzica, G

1

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 98/00849

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 03143 A (ANDERSON W. ET AL.) 18 février 1993 cité dans la demande voir abrégé voir page 1 - page 3 voir page 5 - page 9 * revendications *	1-23
A	US 5 112 767 A (ROY-BURMAN PRADIP ET AL.) 12 mai 1992	13
A	WO 93 05815 A (FILLER AARON GERSHON ;LEVER ANDREW M L (GB)) 1 avril 1993	24
A	WO 96 15813 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER; QUESENBERRY PETER J. (US)) 30 mai 1996	24

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De ide internationale No
PCT/FR 98/00849

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9601324 A	18-01-1996	FR 2722208 A	12-01-1996
		AU 2929595 A	25-01-1996
		CA 2194155 A	18-01-1996
		EP 0769062 A	23-04-1997
		JP 10503644 T	07-04-1998
WO 9405786 A	17-03-1994	DE 4228457 A	28-04-1994
		AU 4953893 A	29-03-1994
		EP 0658199 A	21-06-1995
		JP 8502884 T	02-04-1996
		US 5665567 A	09-09-1997
WO 9405785 A	17-03-1994	DE 4228458 A	01-06-1994
		AU 4953793 A	29-03-1994
		EP 0658198 A	21-06-1995
		JP 8502644 T	26-03-1996
WO 9303143 A	18-02-1993	CA 2114416 A	18-02-1993
		EP 0598029 A	25-05-1994
		JP 6509713 T	02-11-1994
US 5112767 A	12-05-1992	AUCUN	
WO 9305815 A	01-04-1993	AU 669128 B	30-05-1996
		AU 2567992 A	27-04-1993
		CA 2119145 A	01-04-1993
		EP 0610232 A	17-08-1994
		EP 0640350 A	01-03-1995
		JP 7501793 T	23-02-1995
WO 9615813 A	30-05-1996	US 5665350 A	09-09-1997
		AU 4378996 A	17-06-1996