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 15/11, C12Q 1/68, C07K 14/47 — A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 99/42571

(43) Date de publication internationale: 26 août 1999 (26.08.99)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00376

(22) Date de dépôt international: 19 février 1999 (19.02.99)

(30) Données relatives à la priorité:
98/02025 19 février 1998 (19.02.98) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: NOVIMMUNE S.A. [CH/CH]; 26, boulevard Helvétique, CH–1207 Genève (CH).

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant *(US seulement)*: MACH, Bernard [CH/CH]; CH–12921 Chambésy (CH).

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

(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

(54) Title: METHOD FOR SCREENING COMPOUNDS CAPABLE OF INHIBITING FIXING BETWEEN THE TRANSCRIPTION FACTOR OF STAT1 AND THE TRANSCRIPTION FACTOR OF USF1

(54) Titre: METHODE DE CRIBLAGE DE COMPOSES CAPABLES D'INHIBER LA FIXATION ENTRE LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT1 ET LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION USF1

(57) Abstract

The invention concerns a method for determining whether a candidate compound is capable of inhibiting fixing between STAT1 and USF1 polypeptides comprising the following steps: (a) provide all or part of the STAT1 polypeptide capable of fixing with the USF1 polypeptide; (b) providing all or part of the USF1 polypeptide capable of fixing with the STAT1 polypeptide; (c) contacting said polypeptides as defined in (a) and (b) with one said candidate compound in conditions suitable for fixing between the STAT1 and USF1 polypeptides; (d) measuring the fixing between the STAT1 and USF1 polypeptides; and (e) comparing said measurement with the fixing measurement between STAT1 and USF1 polypeptides in similar experimental conditions in the absence of said candidate compound, a decrease in fixing leading to conclude that said compound candidate is capable of inhibiting fixing between STAT1 and USF1 polypeptides.



(57) Abrégé

La présente invention concerne une méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1 comprenant les étapes suivantes: (a) disposer de tout ou partie du polypeptide STAT1 présentant la propriété de se fixer à la polypeptide USF1, (b) disposer de tout ou partie du polypeptide USF1 présentant la propriété de se fixer à la polypeptide STAT1, (c) mettre en contact lesdits polypeptides tels que définis en (a) et (b) avec undit composé candidat dans des conditions permettant la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1, (d) mesurer la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1, et (e) comparer cette mesure avec la mesure de la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1 observée dans les mêmes conditions expérimentales en absence dudit composé candidat, une diminution de la fixation permettant de conclure que ledit composé candidat est capable d'inhiber la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1.

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

METHODE DE CRIBLAGE DE COMPOSES CAPABLES D'INHIBER LA FIXATION ENTRE LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT1 ET LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION USF1

La présente invention concerne une méthode permettant d'identifier des composés capables d'inhiber l'activation par les cytokines, notamment par l'interféron γ , de l'expression du gène CIITA qui lui même est impliqué dans le contrôle et la régulation de l'expression de gènes codant pour des molécules MHC de type II.

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (désigné ci-après MHC), de classe II sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires directement impliquées dans l'activation des lymphocytes T helper CD4+ au cours de la réponse immunitaire.

Chez l'homme, ce complexe de classe II est représenté par les molécules appartenant au système HLA (Human Leucocyte Antigen). Les gènes codant pour les chaînes α et β constituant les molécules HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP sont localisés au niveau de la région D du chromosome 6.

L'expression de ces gènes est parfaitement régulée. Contrairement aux gènes codant pour les molécules MHC de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire, les gènes codant pour les molécules du MHC de classe II sont exprimés soit de manière constitutive uniquement dans quelques types cellulaires tels que les lymphocytes B, les lymphocytes T activés, les macrophages, les cellules de l'épithélium thymique, les cellules dendritiques telles que par exemple les cellules de Langerhans, soit de manière induite après stimulation, par exemple par des cytokines, et plus particulièrement par l'interféron γ (INF γ) ou l'interleukine 4 (IL4), dans plusieurs autres types cellulaires tels que par exemple les cellules appartenant à la lignée des macrophages ou des monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires ou les cellules cancéreuses telles que par exemple des cellules de mélanome.

En outre, dans les lymphocytes B, l'expression des gènes codant pour les molécules MHC de classe II, est transitoire. En effet, la différenciation des cellules B en plasmocytes produisant les immunoglobulines, s'accompagne de l'extinction de

certains gènes, dont ceux codant pour le MHC de classe II.

De même, il a été montré que le taux d'expression des molécules MHC de type II constitue un facteur déterminant du processus d'activation des cellules T.

En conséquence, il apparaît clairement que les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de ces gènes constituent un élément clé de l'efficacité de la réponse immunitaire. Tout défaut dans ce procédé de régulation peut aboutir à d'importants troubles immunologiques, ou maladies auto-immunes. Ainsi, dans certains cas, une expression anormale des gènes MHC de classe II a été observée à la surface de cellules qui normalement ne devraient pas exprimer de tels gènes. De même, une sur-expression de ces gènes peut être observée qui conduit à une activation aberrante et non contrôlée des lymphocytes CD4+ [BOTTAZZO et al., 1986, Immunol. Rev., 94, 137-169]. De telles manifestations pourraient être, au moins en partie, responsables d'affections telles que le diabète insulino dépendant, la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux. A l'inverse, chez certains patients, une immunodéficience a pu être mise en évidence résultant d'un trouble au niveau de l'expression des gènes MHC de classe II. Citons pour exemple le syndrome BLS (bare lymphocytes syndrome) qui est une affection autosomique récessive pour laquelle l'expression des gènes MHC de classe II est très limitée, voire inexistante, ce qui se traduit par l'absence de réponses immunitaires cellulaire et humorale et s'accompagne de nombreuses infections, souvent fatales.

Plusieurs équipes scientifiques ont analysé les mécanismes de régulation de l'expression des gènes MHC de classe II et ont identifié un certain nombre de molécules transactivatrices susceptibles de se fixer, directement ou indirectement, sur des séquences promotrices spécifiques desdits gènes [pour une revue, voir MACH et al., 1996, Annu. Rev. Immunol. 14, 301-331].

Le déposant a précédemment identifié et caractérisé l'un de ces facteurs, le facteur CIITA (class II transactivator)[STEIMLE et al., 1993, Cell 75, 135-146 et EP 648836]. Le document WO 9606107 montre en outre qu'il existe deux domaines au sein du facteur CIITA plus impliqués dans l'activation de la transcription des gènes MHC de classe II. Néanmoins, de manière surprenante et contrairement à ce qui est observé pour les autres facteurs impliqués dans la régulation de l'expression des

gènes MHC de classe II (COGSWELL et al., 1991, Crit. Rev. Immunol. 11, 87-112), STEIMLE et al. ont montré que l'expression du facteur CIITA coïncide étroitement avec l'expression des gènes MHC de classe II et est absolument requise tant pour l'expression constitutive que pour l'induction desdits gènes MHC. Par ailleurs, SILACCI et al (1994, J. Exp. Med., 180, 1329-1336) ont montré que l'extinction des gènes MHC de classe II lors de la différenciation des plasmocytes est associée à l'extinction du gène codant pour le facteur CIITA.

Par ailleurs, LENNON et al. (1997 , Immunogenetics , 45, 266-273) ont identifié la séquence promotrice d'un gène CIITA responsable de l'expression différentielle de ce facteur dans les cellules B. Toutefois, l'existence de cette seule séquence ne permet pas d'expliquer pourquoi on observe une expression différentielle du facteur CIITA dans différents types cellulaires. En outre, elle ne rend pas compte de l'induction par les cytokines.

Dans des travaux antérieurs, le déposant a identifié, à partir d'échantillons issus de différents tissus d'origine humaine, l'organisation complexe des séquences assurant le contrôle de l'expression du facteur CIITA, isolé et caractérisé plusieurs régions promotrices et mis en évidence l'existence de différentes formes du facteur CIITA, et également de différents gènes CIITA. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851-2860) et d'un dépôt d'une demande de brevet français n° 97/04954 dont les contenus font partie intégrante de la présente demande. Ainsi, les inventeurs ont montré que les différents promoteurs identifiés peuvent être activés de manière sélective : deux des promoteurs sont responsables de l'expression constitutive du gène CIITA dans les cellules dendritiques (promoteur I) et dans les lymphocytes B (promoteur III) alors que le promoteur IV intervient lors de l'expression du gène CIITA après induction par une cytokine, notamment l'interféron γ.

Plus particulièrement, les inventeurs ont identifié une séquence capable d'exprimer une activité de promoteur transcriptionnel après induction par une

cytokine, telle que par exemple l'interféron γ ou l'interleukine 4.Une telle séquence est représentée par la séquence comprenant tout ou partie d'une séquence identifiée SEQ ID n°1, ou sa séquence complémentaire. L'analyse de cette séquence permet d'identifier plusieurs régions correspondant à des sites de régulation *en cis* de l'expression, tels que notamment le site NF-GMa, l'élément GAS, la boîte E ou le site de fixation du facteur IRF-1 (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851-2860 et Figure 1).

Récemment, plusieurs travaux ont permis de mieux comprendre la succession d'évènements et de signaux impliqués dans l'activation de gènes exprimés en réponse à l'induction par une cytokine, notamment par l'interféron γ. Un shéma d'activation a été proposé par Darnel et al. (1997, Science 277, 1630-1635). Selon ce modèle , dans un premier temps, la cytokine activatrice, l'interféron γ par exemple, se fixe sur ses récepteurs cellulaires de surface permettant ainsi l'activation des tyrosines kinases JAK1 et JAK2 cellulaires. Dans un second temps, les résidus tyrosine du facteur de transcription STAT1, localisé dans le cytoplasme des cellules, sont phosphorilés par les kinases JAK activées. Cette phosphorylation permet, dans un troisième temps, au facteur STAT1 activé de migrer dans le noyau où il se fixe sur la boite GAS des promoteurs inductibles par les cytokines (ex. Interféron γ) permettant ainsi l'expression activée des gènes placés sous le contrôle de tels promoteurs.

L'implication d'un tel système d'activation JAK/STAT1 dans le contrôle de l'expression des gènes CIITA inductibles par l'interféron γ a fait l'objet d'études qui permettent de constater que, comme dans le cas d'autres gènes inductibles par l'interféron γ, l'expression du facteur CIITA ne peut pas être induite dans des lignées cellulaires déficientes pour JAK1 (Chang et al., 1994, J. Exp. Med., 180, 1367-1374).

De même, Meraz et al. (1996, Cell, 84, 431-442) ont montré que l'expression du gène CIITA n'est pas induite par l'interféron γ dans les macrophages de la moelle osseuse issue de souris STAT1$^{-/-}$, suggérant ainsi un rôle déterminant de STAT1 dans l'induction de l'expression du gène CIITA par l'interféron γ.

En outre, Lee et Benveniste (1996, J. Immunol., 157, 1559-1568) ont montré par des expériences utilisant des oligonucléotides antisens spécifiques de la séquence d'acide nucléique codant pour le facteur protéique STAT1, que la réduction de l'expression de la protéine STAT1 s'accompagne d'une réduction de l'expression du gène CIITA pouvant être observée après induction par l'interféron γ.

Enfin, il a été montré que le facteur STAT1 reconnait spécifiquement une séquence d'acide nucléique particulière appelée «élément GAS» (Darnel et al. 1997, Science 277, 1630-1635). L'analyse de la séquence du promoteur IV du gène CIITA (inductible par les cytokines ; Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851-2860 - et Figure 1) a révélé la présence d'une telle séquence.

Comme cela est précisé plus haut, le promoteur IV renferme également la séquence CACGTG (boîte E, Gregor et al., 1990, Genes Dev., 4, 1730-1740 , voir Figure 1). Ceci pourrait indiquer qu'un facteur de transcription appartenant à la famille des hélice/boucle/hélice/leucine zipper est susceptible d'intervenir dans la régulation de l'expression des gènes placés sous le contrôle du promoteur IV. Plusieurs facteurs appartenant à cette famille sont décrits dans la littérature, citons notamment les facteurs de transcription exprimés de manière constitutive tels que les facteurs TFE3 (Beckmann et al, 1990, Genes Dev., 4, 167-179), USF1 (Gregor et al., 1990, Genes Dev., 4, 1730-1740) et USF2 (Sirito et al., 1994, Nucleic Acid Res. 22, 427-433) ou des protéines impliquées dans le système Myc telles que Myc-Max ou Mad-Max (Ayer et al., 1993, Cell 72, 211-222).

Plus particulièrement, le facteur de transcription USF1 est exprimé de manière ubiquitaire et participe à la régulation de l'expression de différents gènes dont certains sont exprimés de manière «tissus spécifique» ou de façon inductible, tels que par exemple le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (Peritz et al., 1988, J. Biol. Chem., 263, 5005-5007), le gène codant pour la chaîne λ2 des immunoglobulines (Chang et al., 1992, Nucleic Acid Res., 20, 287-293) ou encore le gène codant pour p53 (Reisman et Rotter, 1993, Nucleic Acid Res., 21, 345-350).

Le déposant a maintenant mis en évidence que les facteurs de transcription STAT1 et USF1 se fixent respectivement sur les élément GAS et sur la boîte E du promoteur IV. Toutefois, de manière très surprenante, le déposant a également montré que la fixation du facteur STAT1 sur le site GAS est fortement stabilisée par le facteur USF1 et que ces facteurs se lient de manière coopérative aux sites de fixation localisés sur le promoteur IV, cette interaction coopérative jouant un rôle déterminant dans le contrôle de l'activation spécifique du promoteur IV par les cytokines, en particulier par l'interféron γ.

Par l'expression «se lient de manière coopérative» on entend indiquer qu'il existe une interaction entre les facteurs protéiques dont il est question, qui peut avoir lieu avant ou après leur fixation sur leur site respectif, qui permet notamment de définir des sites d'interaction spécifiques entre lesdits facteurs protéiques et qui se traduit par un effet coopératif. Cet effet coopératif s'entend comme un résultat qui ne peut être observé que lorsque l'interaction dont il est question a lieu, par exemple cet effet coopératif consistera en une stabilisation de la fixation d'au moins un des facteurs protéiques sur son site (étant sous-entendu, grâce à l'interaction existant entre les facteurs protéiques). Selon un cas particulier, l'effet coopératif sera un effet synergique caractérisé en ce que l'effet observé par la mise en oeuvre des facteurs protéiques sera supérieur à l'effet attendu correspondant à la somme des effets individuels observés pour chaqu'un des facteurs.

Ce mécanisme d'induction de l'expression d'un gène placé sous le contrôle du promoteur IV se distingue des autres systèmes précédemment décrits pour les gènes inductibles par l'interféron γ en ce que celui-ci requiert le facteur USF1 en tant que partenaire essentiel pour la fixation et par conséquent pour l'activité du facteur STAT1. La découverte de ce mécanisme, impliqué en particulier dans l'activation par l'interféron γ de l'expression du gène CIITA, et par conséquent dans l'induction par l'interféron γ des molécules MHC de classe II, a conduit le déposant à mettre au point une nouvelle méthode d'identification de molécules capables d'inhiber l'expression

de gènes placés sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité est induite par la fixation coopérative de STAT1 et de USF1, et plus particulièrement de tout ou partie du promoteur IV. De manière préférée, ledit gène est le gène codant pour CIITA.

Par l'expression « séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide CIITA », on entend que la séquence en cause comprend tout ou partie d'une séquence d'acide nucléique correspondant aux ARNm issus de différents tissus ou lignées cellulaires exprimant une activité CIITA de manière constitutive ou après induction. Il peut donc s'agir aussi bien de séquences au moins partiellement codantes que par exemple de séquences intervenant dans le contrôle de l'expression , notamment des séquences ayant une activité de promoteur transcriptionnel.

Par «séquence d'acide nucléique», on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, naturel isolé, ou de synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique.

Par «polypeptide», on entend désigner un enchaînement précis d'amino-acides, indépendamment de sa taille ou de sa fonction, naturel isolé ou de synthèse, modifié ou non.

Par «séquence d'acide nucléique présentant une activité de promoteur transcriptionnel», on entend une séquence d'acide nucléique permettant de contrôler, c'est à dire d'initier et/ou de moduler, la transcription d'au moins un gène, homologue ou hétérologue, localisé en aval de ladite séquence. De même, on parlera de la fonction promotrice desdites séquences ou de promoteur.

Par «gène reporteur», on entend toute séquence d'acide nucléique localisée en aval d'une seconde séquence d'acide nucléique, permettant d'analyser l'activité de promoteur transcriptionnel de ladite seconde séquence. En effet, la transcription de ce gène reporteur se traduit par l'apparition d'un produit (ARN ou polypeptide) aisément détectable selon les techniques conventionnelles bien connues.

Par «facteur de transcription ou polypeptide STAT1» on entend désigner le

facteur de transcription STAT1 qui est capable de se fixer au niveau de l'élément GAS des promoteurs inductibles pas l'interféron γ (Darnell, 1997, Science 277, 1630-1635).

Par «facteur de transcription ou polypeptide USF1» on entend désigner le facteur de transcription USF1 qui est capable de se fixer au niveau de la boîte E de promoteurs tels que par exemple le promoteur du gène codant pour l'hormone de croissance humaine (Peritz et al., 1988, J. Biol. Chem., 263, 5005-5007, du gène codant pour la chaîne λ2 des immunoglobulines (Chang et al., 1992, Nucleic Acid Res., 20, 287-293) ou encore du gène codant pour p53 (Reisman et Rotter, 1993, Nucleic Acid Res., 21, 345-350).

Il convient en outre de préciser que lesdits facteurs STAT1 et USF1 peuvent être d'origine recombinante ou naturelle, et plus particulièrement consister en des facteurs disponibles dans des extraits cellulaires, en particulier nucléaires, préparés à partir de lignée cellulaire, éventuellement stimulée par une cytokine, en particulier par l'interféron γ, exprimant lesdits facteurs. En ce qui concerne plus particulièrement le facteur STAT1, celui ci peut être soit sous une forme non activée (non phosphorilée) soit sous une forme activée (phosphorilée, notamment par l'action de l'enzyme JAK1). Pour la réalisation de la présente invention on choisira de préférence la forme activée de STAT1.

La présente invention concerne en premier lieu une méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1 comprenant les étapes suivantes :

(a) disposer de tout ou partie du polypeptide STAT1 présentant la propriété de se fixer au polypeptide USF1,

(b) disposer de tout ou partie du polypeptide USF1 présentant la propriété de se fixer au polypeptide STAT1,

(c) mettre en contact lesdits polypeptides tels que définis en (a) et (b) avec undit composé candidat dans des conditions permettant la fixation entre les

polypeptides STAT1 et USF1,

(d) mesurer la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1,

et (e) comparer cette mesure avec la mesure de la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1 observée dans les mêmes conditions expérimentales en absence dudit composé candidat, une diminution de la fixation permettant de conclure que ledit composé candidat est capable d'inhiber la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1.

Les polypeptides STAT1 et USF1 utilisées dans le cadre de la présente invention peuvent soit être des polypeptides naturels, extraits par exemple de lignées cellulaires exprimant les gènes correspondants, telle que par exemple la lignée Me67.8, et plus particulièrement présents dans l'extrait nucléaire de telles lignées, lesdites lignées pouvant éventuellement être stimulées par l'interféron γ, soit des protéines recombinantes (Greenlund et al., 1995, Immunity, 2, 677-687 pour STAT1 et Roy et al., 1991, Nature, 354, 245-248 pour USF1). La préparation d'extraits nucléaires à partir de cellules est une technique bien maitrisée par l'homme du métier. Les polypeptides STAT1 et USF1 mis en oeuvre dans la présente invention peuvent ou non conserver leur fonction activatrice d'autres gènes pour lesquels l'effet coopératif des deux polypeptides n'est pas observé (les polypeptides agissent alors séparément). Plus particulièrement il est possible d'utiliser une partie seulement desdits polypeptides STAT1 et/ou USF1 pour autant qu'ils aient conservé leurs propriétés de se fixer l'un à l'autre, et éventuellement la propriété de se fixer sur leurs sites respectifs. Selon un cas préféré de l'invention, le polypeptide STAT1 est capable de se fixer sur l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') parce qu'il est sous sa forme activée (phosphorilée). Cette phosphorilation du polypeptide STAT1 peut notamment être obtenues a) naturellement, dans une cellule exprimant ledit polypeptide induite par une cytokine, de préférence par l'interféron γ, b) par l'action d'une kinase, telle que par exemple JAK1 ou c) chimiquement, par synthèse.

Selon une première variante, l'étape (d) consiste en une mesure indirecte c'est

à dire que dans ce cas particulier on détermine la formation de complexes comprenant STAT1, USF1 et une séquence d'acide nucléique double brin comportant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'). Ce type de méthode est largement décrit dans la littérature, repose généralement sur des expériences de migration électrophorétique (gel retard ou band shift en anglais) et est exemplifié dans la présente demande.

Selon une seconde variante, l'étape (d) consiste en une autre mesure indirecte c'est à dire que dans ce cas, on mesure l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide, ladite expression étant placée sous le contrôle d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), ou sa séquence complémentaire.

Selon un cas préféré de réalisation de l'invention, ladite séquence promotrice est sélectionnée parmi les séquences qui renferment tout ou partie du promoteur IV (SEQ ID N°1), ou de sa séquence complémentaire.

Selon l'invention, lesdites séquences d'acide nucléique dont l'expression est mesurée à l'étape (d) peuvent 1) être des gènes reporteurs tels que par exemple le gène de la β globine de lapin, de la luciférase ou de la β lactamase ou 2) coder pour tout ou partie de polypeptides ayant la séquence en acides aminés d'un facteur CIITA tel que décrit dans la demande de brevet français N° 97 04954 et plus particulièrement tel que défini par SEQ ID N°2. Selon ce dernier cas, on dira alors qu'elles codent pour tout ou partie du polypeptide CIITA

La mesure de l'expression de la séquence d'acide nucléique peut en particulier consister a) en la mesure des ARN messagers spécifiques exprimés à partir de ladite séquence d'acide nucléique ou b) en la mesure du polypeptide exprimé. Des exemples de telles méthodes sont largement développées dans la littérature et leur mise en oeuvre est à la portée de l'homme du métier. A titre d'exemples, on peut citer les techniques telles que celles reposant sur l'hybridation de sondes oligonucléiques marquées dont la séquence est spécifique des ARN que l'on cherche à détecter,

l'amplification par exemple par PCR à l'aide d'amorces dont la séquence est spécifique desdits ARN, la technique de protection contre la dégradation par la RNAse, ... ou encore l'utilisation d'anticorps spécifiques de tout ou partie du polypeptide synthétisé, etc...

Selon un cas particulier et préféré de cette seconde variante de mise en oeuvre de l'invention, l'étape de mesure de l'expression de la séquence d'acide nucléique est réalisée dans des conditions permettant l'induction de ladite expression par une cytokine, et plus particulièrement par l'interféron γ.

Selon une troisième variante de l'invention, l'étape (d) consiste en une mesure directe de formation de complexes entre les polypeptides STAT1 et USF1, par exemple par utilisation d'anticorps spécifiques desdits complexes ou tout autre moyen approprié.

Les méthodes de mesure proposées dans les variantes exposées ci-dessus sont également adaptables pour les méthodes selon l'invention présentées ci-après.

L'invention concerne également une méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide, de préférence pour tout ou partie du polypeptide CIITA (SEQ ID N°2) ou pour tout ou partie d'un gène reporteur placée sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), et de manière préférée d'un promoteur IV (SEQ ID N°1), ou leur séquence complémentaire respective comprenant les étapes suivantes :

(a) disposer de tout ou partie d'un polypeptide STAT1 présentant la propriété de se fixer à la protéine USF1 et sur l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') ,

(b) disposer de tout ou partie de la protéine USF1 présentant la propriété de se fixer à la protéine STAT1 et sur la boîte E (5'-CACGTG-3'),

(c) disposer d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide , de préférence pour tout ou partie du polypeptide CIITA (SEQ ID

N°2) ou pour tout ou partie d'un gène reporteur, dont l'expression est placée sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), et de manière préférée d'un promoteur IV (SEQ ID N°1),

(d) mettre en contact lesdits polypeptides tels que définis en (a) et (b), une dite séquence d'acide nucléique telle que définie en (c) et undit composé candidat,

(e) mesurer l'expression de ladite séquence d'acide nucléique,

et (f) comparer cette mesure avec la mesure de l'expression de ladite séquence d'acide nucléique observée dans les mêmes conditions expérimentales, notamment d'activation de l'expression, en absence dudit composé candidat, une diminution de ladite expression permettant de conclure que ledit composé candidat est capable d'inhiber l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide, notamment pour tout ou partie du polypeptide CIITA ou pour tout ou partie d'un gène reporteur placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), et de manière préférée d'un promoteur IV (SEQ ID N°1).

L'invention concerne également une méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber l'activation par une cytokine, plus particulièrement par l'interféron γ, de l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide, notamment pour tout ou partie du polypeptide CIITA (SEQ ID N°2) ou pour tout ou partie d'un gène reporteur, placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), et de manière préférée d'un promoteur IV (SEQ ID N°1), comprenant les étapes suivantes :

(a) disposer d'une lignée cellulaire exprimant les polypeptides STAT1 et USF1 naturels et fonctionnels, par exemple la lignée Me67.8,

(b) transfecter ladite lignée cellulaire avec un vecteur d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un

polypeptide, notamment pour tout ou partie du polypeptide CIITA (SEQ ID N°2) ou pour tout ou partie d'un gène reporteur, placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), et de manière préférée d'un promoteur IV (SEQ ID N°1),

(c) mettre lesdites cellules en contact avec undit composé candidat ou transfecter les cellules avec un vecteur d'expression permettant l'expression d'undit composé à l'intérieur desdites cellules, dans des conditions autorisant l'activation de l'expression de la séquence d'acide nucléique par une cytokine, de préférence par l'interféron γ

(d) mesurer l'expression de ladite une séquence d'acide nucléique,

et (e) comparer cette mesure avec la mesure de l'expression de ladite séquence d'acide nucléique observée dans les mêmes conditions expérimentales, notamment d'activation de l'expression, en absence dudit composé candidat, une diminution de ladite expression permettant de conclure que ledit composé candidat est capable d'inhiber l'activation par une cytokine, plus particulièrement par l'interféron γ, de l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide, notamment pour tout ou partie du polypeptide CIITA (SEQ ID N°2) ou pour tout ou partie d'un gène reporteur, placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant au moins l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), et de manière préférée d'un promoteur IV (SEQ ID N°1).

Un vecteur d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide placé sous le contrôle de tout ou partie du promoteur IV renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3') peut notamment consister en un vecteur tel que décrit dans la demande de brevet français N° 97 04954 dont le contenu fait partie de la présente demande.

L'invention concerne également des méthodes telles que définies ci dessus permettant d'identifier des composés candidat susceptibles d'inhiber l'expression des

gènes codant pour les molécules MHC de classe II lorsque celle-ci est désirée, notamment dans des conditions pour lesquelles on souhaite agir après induction par une cytokine, et plus particulièrement par l'interféron γ.

De nombreuses affections, directement ou indirectement, liées à un trouble de l'expression des gènes codant pour les molécules MHC de classe II sont décrites dans la littérature. Citons pour exemple, des affections telles que le diabète insulino dépendant, la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux dont l'une des composantes pourrait être une sur-expression des gènes codant pour les molécules MHC de classeII.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après, illustrés par la figure 1. Toutefois, l'invention ne saurait se limiter au contenu desdits exemples.

La Figure 1 présente les différents éléments impliqués dans la régulation de l'expression induite par les cytokines des gènes placés sous le contrôle du promoteur IV.

EXEMPLES.

Matériel et Méthodes

Les cellules

Les lignées cellulaires Me67.8 (mélanome) et THP1 (monocyte) sont cultivées dans un milieu RPMI-1640. Les lignées 2FTGH (fibrosarcome) et U3A (lignée 2FTGH n'exprimant pas STAT1) sont cultivées sur milieu de Dulbecco modifié. Les milieux sont complémentés avec 10% de sérum de veau faetal, 10 U/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine et 2 mM de glutamine. Les incubation sont réalisées à 37°C sous 5% de CO2.

Gènes reporteurs.

L'expression des gènes reporteur est mesurée par RT-PCR quantitative comme décrit dans Sperisen et al., 1992, PCR Meth Appli. 1, 164-170. Les

transfections, la préparation des ARN et les analyses par RT-PCR sont réalisées comme précédemment décrit (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851-2860). Le plasmide PIV-308 renfermen le fragment -308 à +75 de la région flanquante du promoteur IV du gène CIITA sous cloné en aval du gène codant pour la béta globuline de lapin du plasmide pGβG(+). L'activité du promoteur est mesurée par Phosphoimager.

Tests de protection de la dégradation par la RNAse.

Les essais sont réalisés sur 10 µg d'ARN par réaction selon la technique décrite dans Steimle et al., 1993, Cell, 75, 135-146.

Oligonucléotides utilisés.

NGE :5'-GGCCAGGGATTGGGATGCGAGTTCTGATAA AGCAGGTGGTGGCCACAG-3' ; E:5'-gggAAAGCACGTCCTGGCC-3'

Analyse de la mobilité électrophorétique (EMSA)

Les cellules mises en oeuvre sont ou non stimulées par l'interféron γ (500U/ml) pendant 30 min avant la préparation des extraits nucléaires selon la méthode décrite par Harroch et al., 1994, EMBO J., 13, 1942-1949.

Les oligonucléotides radiomarqués à l'une de leur extrémités par l'addition de [γ-32P] ATPsont hybridés à leur séquence complémentaire et purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de manière à obtenir des sondes marquées d'ADN double brin correspondant à tout ou partie du promoteur IV de CIITA.

Pour l'étude de fixation des facteurs protéiques sur la sonde NGE, 6µg de protéines extraites des noyaux des cellules sont mélangés avec 2.10^4 cpm de sonde d'ADN, 1.25 µg de poly (dI) (dC) (Pharmacia), 0.5 µg d'ADN simple brin de E. Coli, avec ou sans compétiteur, dans un volume final de 20 µl [20 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% (v/v) glycérol, 5 mM dithiothréitol, 1 mM spermine et 100 µg de BSA]. Les conditions de fixation des facteurs sur la sonde G sont identiques hormis pour : pas de poly (dI) (dC), pas d'ADN de E coli.

La protéine STAT1 recombinante, putifiée et activée et la protéine USF1

purifiée et recombinante sont utilisées dans des conditions identiques.

Après addition de la sonde nucléique radiomarquée, le mélange est incubé pendant 30 minutes à 20°C.

Pour les expériences de «supershift», les anticorps sont ajoutés et le mélange est placé 20 minutes à 4°C avant de réaliser une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5%. Après séqhage, le gel est autoradiographié. Les résultats sont déterminés par PhosphoImager.

Exemple 1: Mise en évidence de deux types de complexe pouvant se former au niveau de la région GAS/boite E.

Afin d'étudier les complexes ADN/Protéine qui peuvent se former au niveau de la région renfermant les éléments de régulation en cis GAS/boite E du promoteur IV inductible par l'interféron γ que le déposant avait précédemment identifié (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851-2860), des essais de mobilité électrophorétiques ont été réalisés avec des sondes ADN couvrant cette région (NGE) et avec l'extrait nucléaire des cellules Me67.8, après ou sans induction par l'interféron γ.

Avec l'extrait nucléaire préparé à partir de cellules non stimulées, on constate qu'un complexe, noté L pour «lower» , est formé entre l'ADN sonde et au moins une protéine présente dans l'extrait nucléaire.

Avec l'extrait nucléaire préparé à partir de cellules stimulées par l'interféron γ , on constate qu'un autre complexe est formé, noté U pour «upper» qui présente une mobilité électrophorétique moindre.

Afin d'étudier la spécificité et le site de fixation à l'ADN de chacun des complexes identifiés, nous avons réalisé des expériences de compétition en présence de sondes spécifiques de l'élement GAS (G) et de la boîte E (E). Les résultats montrent que le complexe L est seulement déstabilisé en présence de la sonde de compétition E, que l'extrait nucléaire provienne de cellules stimulées ou non par l'interféron γ. Par contre, la formation du complexe U est inhibée par les sondes de

compétion G et E. Ces résultats indiquent par conséquent que le complexe L fait intervenir une protéine capable de se fixer sur la boîte E, qui est présente dans les cellules non stimulées et qu'après stimulation par l'interféron γ, un nouveau complexe peut se former. Nous avons par ailleurs montré par des expériences de mutagénèse dirigées sur les élements GAS et boîte E que la fixation de ce complexe U sur l'ADN n'est possible qu'en présence des séquences GAS et boîte E sauvages.

Ces expériences permettent de conclure que le complexe U est formé d'au moins un facteur capable de se lier à la boîte E et d'une protéine activée par l'interféron γ qui se lie à l'élément GAS. Un candidat possible pour ce second facteur protéique est la protéine STAT1 (Decker et al., 1991, EMBO J., 10, 927-932).

Exemple 2 :

Afin d'évaluer directement le rôle de STAT1 dans la régulation de l'expression du gène CIITA après activation par l'interféron γ, la capacité d'induction du gène CIITA a été étudiée dans une lignée cellulaire déficiente pour STAT1 (U3A) et dans une lignée cellulaire exprimant STAT1 (2FTGH), dans des conditions d'activation par l'interféron γ.

Contrairement à ce que l'on observe dans la lignée 2FTGH, dans la lignée U3A, l'expression des ARN messagers de CIITA ou l'activation du promoteur IV de CIITA ne sont pas induits par la cytokine comme le montrent des expériences de protection à la RNAse et l'analyse de la fonction promotrice par construction de gène reporteurs exprimés sous le contrôle du promoteur à analyser.

Les résultats indiquent que STAT1 contrôle l'activation par l'interféron γ du promoteur IV de CIITA. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Merraz et al., 1996, Cell, 84, 431-442 montrant que les ARN messagers de CIITA ne peuvent pas être induits par l'interféron γ dans les macrophages issus de souris STAT -/-.

Afin d'analyser le rôle de STAT1 au niveau du promoteur IV de CIITA et sa présence au niveau du complexe U, ledit complexe protéique, associé à la sonde NGE marquée a été analysé par «supershift» avec des anticorps monoclonaux spécifiques

de STAT1. Alors que des anticorps monoclonaux non spécifiques n'ont aucun effet sur la migration éléctrophorétique des complexes ADN/protéine U, les anticorps monoclonaux anti-STAT1 retardent considérablement la migration du complexe U, même pour de fortes dilutions (1/2000), alors que la migration du complexe L demeure inchangée. Ceci confirme que la protéine STAT1 est bien l'un des composants du complexe U.

Exemple 3 :

Des essais fonctionnels ont permis de mettre en évidence le rôle majeur joué par la boîte E lors de l'induction par l'interféron γ. La séquence nucléique de la boîte E du promoteur IV de CIITA présente la séquence consensus CACGTG précédemment décrite comme site de fixation sur l'ADN des protéines hélice/boucle/hélice/leucine zipper.

L'utilisation d'anticorps spécifiques du facteur USF1 ont permis de montrer la présence de ce facteur au sein des complexes protéiques U et L. Afin de confirmer que le facteur USF1 est capable de se fixer sur le promoteur IV de CIITA, des expériences de EMSA ont été réalisées en présence de protéine recombinantes USF1. Les résultats montrent que la protéine USF1 est effectivement présente dans les complexes U et L et se fixe spécifiquement sur le promoteur IV de CIITA.

Exemple 4 :

Nous avons ensuite analysé si les protéines STAT1 et USF1 formaient le complexe U de manière coopérative après induction par l'interféron γ. Pour cela, des analyses EMSA ont permis de montrer que contrairement au facteur recombinant USF1 qui peut, seul, se fixer sur la sonde radiomarquée NGE, le facteur STAT1 ne peut pas, par lui-même, se fixer sur la même sonde.Par ailleurs, l'addition de quantités croissantes de STAT1 activé à une quantité donnée d'USF1, en présence d'un excés de sonde NGE libre, favorise la formation de complexes STAT1/USF1 plutôt que la fixation de l'USF1 seul. La quantité de sonde associée aux deux facteurs montre que la fixation de STAT1 et de USF1 est effectuée de manière coopérative car les

quantités de sonde liée audit complexe (17%) est environ deux fois plus élevée que la somme de sonde fixée au facteur USF1 seul (7.6%) et au facteur STAT1 seul (0%).

Cette fixation coopérative est également observée avec des extraits nucléaires issus de cellules non stimulées Me67.8 et de facteur STAT1 recombinant activé. Les complexes formés avec les protéines recombinantes présentent les mêmes profils de migration électrophorétiques que ceux obtenus avec des extraits nucléaires de cellules Me67.8 stimulées par l'interféron γ.

REVENDICATIONS

1 - Méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1 comprenant les étapes suivantes :

(a) disposer de tout ou partie du polypeptide STAT1 présentant la propriété de se fixer à la polypeptide USF1,

(b) disposer de tout ou partie du polypeptide USF1 présentant la propriété de se fixer à la polypeptide STAT1,

(c) mettre en contact lesdits polypeptides tels que définis en (a) et (b) avec undit composé candidat dans des conditions permettant la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1,

(d) mesurer la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1,

et (e) comparer cette mesure avec la mesure de la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1 observée dans les mêmes conditions expérimentales en absence dudit composé candidat, une diminution de la fixation permettant de conclure que ledit composé candidat est capable d'inhiber la fixation entre les polypeptides STAT1 et USF1.

2 - Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'étape (d) consiste en la mesure de la formation de complexes comprenant STAT1, USF1 et une séquence d'acide nucléique double brin comportant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3').

3 - Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'étape (d) consiste en la mesure de l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide, ladite expression étant placée sous le contrôle d'une séquence promotrice renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'), ou sa séquence complémentaire.

4 - Méthode selon la revendication 2 ou 3 caractérisée en ce que ladite séquence d'acide nucléique double brin ou ladite séquence promotrice,

respectivement, renferme tout ou partie du promoteur IV (SEQ ID N°1), ou de sa séquence complémentaire.

5 - Méthode selon les revendications 3 ou 4 caractérisée en ce que ledit polypeptide est le polypeptide CIITA (SEQ ID N°2).

6 - Méthode selon les revendications 3 ou 4 caractérisée en ce que ledit polypeptide est le polypeptide β globine de lapin, la luciférase ou la β lactamase.

7 - Méthode selon les revendications 3 à 6 caractérisée en ce que la mesure de l'expression de ladite séquence d'acide nucléique est réalisée dans des conditions permettant l'induction de ladite expression par une cytokine, et de préférence par l'interféron γ.

8 - Méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3') comprenant les étapes suivantes:

(a) disposer de tout ou partie d'un polypeptide STAT1 présentant la propriété de se fixer à la protéine USF1 et sur l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3'),

(b) disposer de tout ou partie d'un polypeptide USF1 présentant la propriété de se fixer à la protéine STAT1 et sur la boîte E (5'-CACGTG-3'),

(c) disposer d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide dont l'expression est placée sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'),

(d) mettre en contact lesdits polypeptides tels que définis en (a) et (b), une dite séquence d'acide nucléique telle que définie en (c) et undit composé candidat,

(e) mesurer l'expression de ladite une séquence d'acide nucléique,

et (f) comparer cette mesure avec la mesure de l'expression de ladite séquence d'acide nucléique observée dans les mêmes conditions expérimentales, notamment d'activation de l'expression, en absence dudit composé candidat, une diminution de ladite expression permettant de conclure que ledit composé candidat est capable d'inhiber l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3').

9 - Méthode pour déterminer si un composé candidat est capable d'inhiber l'activation par une cytokine, de préférence par l'interféron γ, de l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3') comprenant les étapes suivantes:

(a) disposer d'une lignée cellulaire exprimant les polypeptides STAT1 et USF1 naturels et fonctionnels,

(b) transfecter ladite lignée cellulaire avec un vecteur d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3'),

(c) mettre lesdites cellules en contact avec undit composé candidat ou transfecter les cellules avec un vecteur d'expression permettant l'expression d'undit composé à l'intérieur desdites cellules, dans des conditions autorisant l'activation de l'expression de la séquence d'acide nucléique par une cytokine , de préférence par l'interféron γ,

(d) mesurer l'expression de ladite une séquence d'acide nucléique,

et (e) comparer cette mesure avec la mesure de l'expression de ladite une séquence d'acide nucléique observée dans les mêmes conditions expérimentales, notamment d'activation de l'expression, en absence dudit composé candidat, une diminution de ladite expression permettant de conclure que ledit composé candidat

est capable d'inhiber l'activation par une cytokine, de préférence par l'interféron γ, de l'expression d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide placé sous le contrôle de tout ou partie d'un promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3').

10 - Méthode selon la revendication 9 caractérisée en ce que la lignée cellulaire est la lignée Me67.8.

11 - Méthode selon les revendications 8 à 10 caractérisée en ce que ladite séquence d'acide nucléique code pour tout ou partie du polypeptide CIITA (SEQ ID N°2).

12 - Méthode selon les revendications 8 à 10 caractérisée en ce que ladite séquence d'acide nucléique code pour tout ou partie d'un gène reporteur, plus particulièrement pour tout ou partie de la β globine de lapin , de la luciférase ou de la β lactamase.

13 - Méthode selon les revendications 8 à 10 caractérisée en ce que ledit promoteur renfermant l'élément GAS (5'-TTCTGATAAA-3') et la boîte E (5'-CACGTG-3') est le promoteur IV (SEQ ID N°1).

14 - Méthode selon les revendications 8 à 13 caractérisée en ce que la mesure de l'expression de ladite séquence d'acide nucléique consiste en la mesure des ARN messagers spécifiques exprimés à partir de ladite séquence d'acide nucléique.

15 - Méthode selon les revendications 8 à 13 caractérisée en ce que la mesure de l'expression de ladite séquence d'acide nucléique consiste en la mesure du polypeptide exprimé.

GGGGAGAAGTCAGAGGTAACCTTGCCCCCTCCCTCAATTCCAGATGAGGAAATTCAGGCC
TGAAAAGGGAAAGTGACCACCTCAAAGTCTCATGCCTTGGAGGACCCAGCAGGAATCCAA
GACCTCTGAAAAGGACCGGCAGGGCTCTTGCCACGGCTGGGGGTGTGGTCATGGTAACAC
AGGTTTTCCATCCATGGAAGGTACCTGAGGGATTTTCTCTTCCTCCCTAGGGCCAGCATC
AGAGGAGTGAATAGCTCAGTTAGCTCATCTCAGGGGCCATGTGCCCTCGGAGGTGGTTTG
CCACTTTCACGGTTGGACTGAGTTGGAGAGAAACAGAGACCCACCCAGGGGTGGGGACAA
GCTCCCTGCAACTCAGGACTTGCAGATCACTTGCCCAAGTGGCTCCCTAGCTCCTGGCTC

NfκB
CTGGCCCGGGGCCTGGGACTCTCCCCGAAGTGGGGCTGGCCACTGTGAGGAACCGACTGG

NFGMa GAS Ebox
AGGCAGGGACCTCTTGGATGCCCCAGGCAGTTGGGATGCCACTTCTGATAAAGCACGTGG

TGGCCACAGTAGGTGCTTGGTTGCTCCACAGCCTGGCCCGAGCTCAGCGCTGCAGAAAGA

IRF1/2
AAGTGAAAGGGAAAAAGAACTGCGGGGAGGCGGGGAGGTAGGATGACCAGCGGACGAGCT

+1
GCCACAGACTTGCCGCGGCCCCAGAGCTGGCGGGAGGGAGAGGCCACCAGCAGCGCGCGC
GGGAGCCCGGGGAACAGCGGCAGCTCACAGTGTGCCACCATG

Figure 1

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> Transgene SA

<120> Méthode de criblage de composés capables d'inhiber la fixation entre le facteur de transcription STAT1 et le facteur de transcription USF1

<130> D17374

<140>
<141>

<150> FR 98 02025
<151> 1998-02-19

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 664
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
ggggagaagt cagaggtaac cttgcccccc ccctcaattc cagatgagga aattcaggcc 60
tgaaaaggga aagtgaccac ctcaaagtct catgccttgg aggacccagc aggaatccaa 120
gacctctgaa aaggaccggc agggctcttg ccacggctgg gggtgtggtc atggtaacac 180
aggttttcca tccatggaag gtacctgagg gatttttctct tcctccctag ggccagcatc 240
agaggagtga atagctcagt tagctcatct caggggccat gtgccctcgg aggtggtttg 300
ccactttcac ggttggactg agttggagag aaacagagac ccacccaggg gtggggacaa 360
gctccctgca actcaggact tgcagatcac ttgcccaagt ggctccctag ctcctggctc 420
ctggcccggg gcctgggact ctccccgaag tggggctggc cactgtgagg aaccgactgg 480
aggcagggac ctcttggatg ccccaggcag ttgggatgcc acttctgata aagcacgtgg 540
tggccacagt aggtgcttgg ttgctccaca gcctggcccg agctcagcgc tgcagaaaga 600
aagtgaaagg gaaaaagaac tgcggggagg cggggaggta ggatgaccag cggacgagct 660
gcca 664

<210> 2
<211> 4441
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2
cagacttgcc gcggccccag agctggcggg agggagaggc caccagcagc gcgcgcggga 60
gcccggggaa cagcggcagc tcacagtgtg ccaccatgga gttggggccc ctagaaggtg 120
gctacctgga gcttcttaac agcgatgctg acccccctgtg cctctaccac ttctatgacc 180
agatggacct ggctggagaa gaagagattg agctctactc agaacccgac acagacacca 240
tcaactgcga ccagttcagc aggctgttgt gtgacatgga aggtgatgaa gagaccaggg 300
aggcttatgc caatatcgcg gaactggacc agtatgtctt ccaggactcc cagctggagg 360
gcctgagcaa ggacattttc aagcacatag gaccagatga agtgatcggt gagagtatgg 420
agatgccagc agaagttggg cagaaaagtc agaaaagacc cttcccagag gagcttccgg 480
cagacctgaa gcactggaag ccagctgagc cccccactgt ggtgactggc agtctcctag 540
tgggaccagt gagcgactgc tccaccctgc cctgcctgcc actgcctgcg ctgttcaacc 600
aggagccagc ctccggccag atgcgcctgg agaaaaccga ccagattccc atgcctttct 660
ccagttcctc gttgagctgc ctgaatctcc ctgagggacc catccagttt gtccccacca 720
tctccactct gccccatggg ctctggcaaa tctctgaggc tggaacaggg gtctccagta 780
tattcatcta ccatggtgag gtgccccagg ccagccaagt acccccctccc agtggattca 840
ctgtccacgg cctcccaaca tctccagacc ggccaggctc caccagcccc ttcgctccat 900
cagccactga cctgcccagc atgcctgaac ctgccctgac ctcccgagca aacatgacag 960

agcacaagac gtcccccacc caatgcccgg cagctggaga ggtctccaac aagcttccaa 1020
aatggcctga gccggtggag cagttctacc gctcactgca ggacacgtat ggtgccgagc 1080
ccgcaggccc ggatggcatc ctagtggagg tggatctggt gcaggccagg ctggagagga 1140
gcagcagcaa gagcctggag cgggaactgg ccaccccgga ctgggcagaa cggcagctgg 1200
cccaaggagg cctggctgag gtgctgttgg ctgccaagga gcaccggcgg ccgcgtgaga 1260
cacgagtgat tgctgtgctg ggcaaagctg gtcagggcaa gagctattgg gctggggcag 1320
tgagccgggc ctgggcttgt ggccggcttc cccagtacga ctttgtcttc tctgtccccc 1380
gccattgctt gaaccgtccg ggggatgcct atggcctgca ggatctgctc ttctccctgg 1440
gcccacagcc actcgtggcg gccgatgagg ttttcagcca catcttgaag agacctgacc 1500
gcgttctgct catcctagac gccttcgagg agctggaagc gcaagatggc ttcctgcaca 1560
gcacgtgcgg accggcaccg gcggagccct gctccctccg ggggctgctg gccggccttt 1620
tccagaagaa gctgctccga ggttgcaccc tcctcctcac agcccggccc cggggccgcc 1680
tggtccagag cctgagcaag gccgacgccc tatttgagct gtccggcttc tccatggagc 1740
aggcccaggc atacgtgatg cgctactttg agagctcagg gatgacagag caccaagaca 1800
gagccctgac gctcctccgg gaccggccac ttcttctcag tcacagccac agccctactt 1860
tgtgccgggc agtgtgccag ctctcagagg ccctgctgga gcttggggag gacgccaagc 1920
tgccctccac gctcacggga ctctatgtcg gcctgctggg ccgtgcagcc ctcgacagcc 1980
cccccggggc cctggcagag ctggccaagc tggcctggga gctgggccgc agacatcaaa 2040
gtaccctaca ggaggaccag ttcccatccg cagacgtgag gacctgggcg atggccaaag 2100
gcttagtcca acacccaccg cgggccgcag agtccgagct ggccttcccc agcttcctcc 2160
tgcaatgctt cctgggggcc ctgtggctgg ctctgagtgg cgaaatcaag gacaaggagc 2220
tcccgcagta cctagcattg accccaagga agaagaggcc ctatgacaac tggctggagg 2280
gcgtgccacg ctttctggct gggctgatct tccagcctcc cgcccgctgc ctgggagccc 2340
tactcgggcc atcggcggct gcctcggtgg acaggaagca gaaggtgctt gcgaggtacc 2400
tgaagcggct gcagccgggg acactgcggg cgcggcagct gcttgagctg ctgcactgcg 2460
cccacgaggc cgaggaggct ggaatttggc agcacgtggt acaggagctc cccggccgcc 2520
tctcttttct gggcacccgc ctcacgcctc ctgatgcaca tgtactgggc aaggccttgg 2580
aggcggcggg ccaagacttc tccctggacc tccgcagcac tggcatttgc ccctctggat 2640
tggggagcct cgtgggactc agctgtgtca cccgtttcag ggctgccttg agcgacacgg 2700
tggcgctgtg ggagtccctg cggcagcatg gggagaccaa gctacttcag gcagcagagg 2760
agaagttcac catcgagcct ttcaaagcca agtccctgaa ggatgtggaa gacctgggaa 2820
agcttgtgca gactcagagg acgagaagtt cctcggaaga cacagctggg gagctccctg 2880
ctgttcggga cctaaagaaa ctggagtttg cgctgggccc tgtctcaggc ccccaggctt 2940
tccccaaact ggtgcggatc ctcacggcct tttcctccct gcagcatctg gacctggatg 3000
cgctgagtga gaacaagatc ggggacgagg gtgtctcgca gctctcagcc accttccccc 3060
agctgaagtc cttggaaacc ctcaatctgt cccagaacaa catcactgac ctgggtgcct 3120
acaaactcgc cgaggccctg ccttcgctcg ctgcatccct gctcaggcta agcttgtaca 3180
ataactgcat ctgcgacgtg ggagccgaga gcttggctcg tgtgcttccg gacatggtgt 3240
ccctccgggt gatggacgca agttcacggc tgccggggcc cagcagctcg ctgccagcct 3300
tcggaggtgt cctcatgtgg agacgctggc gatgtggacg cccaccatcc cattcagtgt 3360
ccaggaacac ctgcaacaac aggattcacg gatcagcctg agatgatccc agctgtgctc 3420
tggacaggca tgttctctga ggacactaac cacgctggac cttgaactgg gtacttgtgg 3480
acacagctct tctccaggct gtatcccatg aggcctcagc atcctggcac ccggcccctg 3540
ctggttcagg gttggcccct gcccggctgc ggaatgaacc acatcttgct ctgctgacag 3600
acacaggccc ggctccaggc tcctttagcg cccagttggg tggatgcctg gtggcagctg 3660
cggtccaccc aggagccccg aggccttctc tgaaggacat tgcggacagc cacggccagg 3720
ccagagggag tgacagaggc agccccattc tgcctgccca ggcccctgcc accctgggga 3780
gaaagtactt ctttttttttt atttttagac agagtctcac tgttgcccag gctggcgtgc 3840
agtggtgcga tctgggttca ctgcaacctc cgcctcttgg gttcaagcga ttcttctgct 3900
tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc acccaccatc atgtctggct aatttttcat 3960
ttttagtaga gacagggttt tgccatgttg gccaggctgg tctcaaactc ttgacctcag 4020
gtgatccacc cacctcagcc tcccaaagtg ctggggatta caagcgtgag ccactgcacc 4080
gggccacaga gaaagtactt ctccaccctg ctctccgacc agacaccttg acagggcaca 4140
ccgggcactc agaagacact gatgggcaac ccccagcctg ctaattcccc agattgcaac 4200
aggctgggct tcagtggcag gctgcttttg tctatgggac tcaatgcact gacattgttg 4260
gccaaagcca aagctaggcc tggccagatg caccaggccc ttagcaggga aacagctaat 4320
gggacactaa tggggcggtg agaggggaac agactggaag cacagcttca tttcctgtgt 4380
ctttttttcac tacattataa atgtctcttt aatgtcacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440
a 4441

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/11 C12Q1/68 C07K14/47

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 C12Q C07K

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	MUHLETHALER-MOTTET A ET AL: "Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF -1." IMMUNITY, (1998 FEB) 8 (2) 157-66., XP002083358	1-15
Y	the whole document	1-15

X	WO 95 28482 A (LIGAND PHARM INC) 26 October 1995 (1995-10-26) page 9, line 16 - page 11, line 13	9,12,14, 15
Y	claims 1-6,10,34,36	1-15

	-/--	

[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
8 July 1999	21/07/1999

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	Andres, S

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00376

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUHLETHALER-MOTTET A ET AL: "EXPRESSION OF MHC CLASS II MOLECULES IN DIFFERENT CELLULAR AND FUNCTIONAL COMPARTMENTS IS CONTROLLED BY DIFFERENTIAL USAGE OF MULTIPLE PROMOTORS OF THE TRANSACTIVATOR CIITA" EMBO JOURNAL, vol. 16, no. 10, 15 May 1997 (1997-05-15), pages 2851-2860, XP002051561 cited in the application the whole document	9,10, 12-15
X	PISKURICH J F ET AL: "IDENTIFICATION OF DINSTINCT REGIONS OF 5' FLANKING DNA THAT MEDIATE CONSTITUTIVE, IFN-GAMMA, STAT1, AND TNF-BETA-REGULATED EXPRESSION OF THE CLASS II TRANSACTIVATOR GENE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 160, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 233-240, XP002073465 the whole document	9,11-15
X	WO 95 28492 A (LIGAND PHARM INC) 26 October 1995 (1995-10-26) page 5, line 24 - page 7, line 18	9,12,14, 15
A	LENNON A -M ET AL: "ISOLATION OF A B-CELL-SPECIFIC PROMOTER FOR THE HUMAN CLASS II TRANSACTIVATOR" IMMUNOGENETICS, vol. 45, no. 4, 1997, pages 266-273, XP002051562 cited in the application the whole document	1-15
A	WO 96 15265 A (GEN HOSPITAL CORP) 23 May 1996 (1996-05-23) page 17, line 8 - page 22, line 25 claims 17,18	
P,X	EP 0 874 049 A (TRANSGENE, S.A.) 28 October 1998 (1998-10-28) cited in the application page 6, line 48 - line 52 figure 4; example 3 examples 5-7	9,10, 12-15

-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/FR 99/00376

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PISKURICH J F ET AL: "Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (JAN 1999) VOL. 19, NO. 1, PP. 431-440., XP002108509 the whole document	9,12-15

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No
PCT/FR 99/00376

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9528482 A	26-10-1995	US 5707803 A	13-01-1998
		AU 2285995 A	10-11-1995
		AU 9713798 A	11-02-1999
		CA 2165057 A	26-10-1995
		EP 0722497 A	24-07-1996
		JP 9500026 T	07-01-1997
		US 5814517 A	29-09-1998
		AU 681025 B	14-08-1997
		AU 2287695 A	10-11-1995
		EP 0755453 A	29-01-1997
		JP 9511908 T	02-12-1997
		WO 9528492 A	26-10-1995
WO 9528492 A	26-10-1995	US 5707803 A	13-01-1998
		AU 681025 B	14-08-1997
		AU 2287695 A	10-11-1995
		CA 2182561 A	26-10-1995
		EP 0755453 A	29-01-1997
		JP 9511908 T	02-12-1998
		AU 2285995 A	10-11-1995
		AU 9713798 A	11-02-1999
		CA 2165057 A	26-10-1995
		EP 0722497 A	24-07-1996
		JP 9500026 T	07-01-1997
		WO 9528482 A	26-10-1995
WO 9615265 A	23-05-1996	US 5643726 A	01-07-1997
		AU 4462196 A	06-06-1996
		CA 2204871 A	23-05-1996
		EP 0791077 A	27-08-1997
		JP 10509321 T	14-09-1998
EP 874049 A	28-10-1998	FR 2762327 A	23-10-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 99/00376

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/11 C12Q1/68 C07K14/47

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 consultee (systeme de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C12Q C07K

Documentation consultee autre que la documentation minimale dans la mesure ou ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de donnees electronique consultee au cours de la recherche internationale (nom de la base de donnees, et si realisable, 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	MUHLETHALER-MOTTET A ET AL: "Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF -1." IMMUNITY, (1998 FEB) 8 (2) 157-66., XP002083358	1-15
Y	le document en entier	1-15
X	WO 95 28482 A (LIGAND PHARM INC) 26 octobre 1995 (1995-10-26) page 9, ligne 16 - page 11, ligne 13	9,12,14, 15
Y	revendications 1-6,10,34,36	1-15

-/--

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

[X] Les documents de familles de brevets sont indiques en annexe

° Catégories speciales de documents cites:

"A" document définissant l'etat general de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour determiner la date de publication d'une autre citation ou pour une raison speciale (telle qu'indiquée)

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

"P" document publie avant la date de dépôt international, mais postérieurement a la date de priorite revendiquee

"T" document ulterieur publié après la date de depôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'etat de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la theorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquee ne peut être considerée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considere isolement

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquee ne peut être considérée comme impliquant une activite inventive lorsque le document est associe à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison etant evidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevee	Date d'expedition du present rapport de recherche internationale
8 juillet 1999	21/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargee de la recherche internationale	Fonctionnaire autorise
Office Europeen 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	Andres, S

1

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

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MUHLETHALER-MOTTET A ET AL: "EXPRESSION OF MHC CLASS II MOLECULES IN DIFFERENT CELLULAR AND FUNCTIONAL COMPARTMENTS IS CONTROLLED BY DIFFERENTIAL USAGE OF MULTIPLE PROMOTORS OF THE TRANSACTIVATOR CIITA" EMBO JOURNAL, vol. 16, no. 10, 15 mai 1997 (1997-05-15), pages 2851-2860, XP002051561 cité dans la demande le document en entier	9,10, 12-15
X	PISKURICH J F ET AL: "IDENTIFICATION OF DINSTINCT REGIONS OF 5' FLANKING DNA THAT MEDIATE CONSTITUTIVE, IFN-GAMMA, STAT1, AND TNF-BETA-REGULATED EXPRESSION OF THE CLASS II TRANSACTIVATOR GENE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 160, no. 1, janvier 1998 (1998-01), pages 233-240, XP002073465 le document en entier	9,11-15
X	WO 95 28492 A (LIGAND PHARM INC) 26 octobre 1995 (1995-10-26) page 5, ligne 24 - page 7, ligne 18	9,12,14, 15
A	LENNON A -M ET AL: "ISOLATION OF A B-CELL-SPECIFIC PROMOTER FOR THE HUMAN CLASS II TRANSACTIVATOR" IMMUNOGENETICS, vol. 45, no. 4, 1997, pages 266-273, XP002051562 cité dans la demande le document en entier	1-15
A	WO 96 15265 A (GEN HOSPITAL CORP) 23 mai 1996 (1996-05-23) page 17, ligne 8 - page 22, ligne 25 revendications 17,18	
P,X	EP 0 874 049 A (TRANSGENE, S.A.) 28 octobre 1998 (1998-10-28) cité dans la demande page 6, ligne 48 - ligne 52 figure 4; exemple 3 exemples 5-7	9,10, 12-15

-/--

1

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visees
P,X	PISKURICH J F ET AL: "Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (JAN 1999) VOL. 19, NO. 1, PP. 431-440., XP002108509 le document en entier	9,12-15

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

[ande Internationale No
PCT/FR 99/00376

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9528482 A	26-10-1995	US 5707803 A	13-01-1998
		AU 2285995 A	10-11-1995
		AU 9713798 A	11-02-1999
		CA 2165057 A	26-10-1995
		EP 0722497 A	24-07-1996
		JP 9500026 T	07-01-1997
		US 5814517 A	29-09-1998
		AU 681025 B	14-08-1997
		AU 2287695 A	10-11-1995
		EP 0755453 A	29-01-1997
		JP 9511908 T	02-12-1997
		WO 9528492 A	26-10-1995
WO 9528492 A	26-10-1995	US 5707803 A	13-01-1998
		AU 681025 B	14-08-1997
		AU 2287695 A	10-11-1995
		CA 2182561 A	26-10-1995
		EP 0755453 A	29-01-1997
		JP 9511908 T	02-12-1998
		AU 2285995 A	10-11-1995
		AU 9713798 A	11-02-1999
		CA 2165057 A	26-10-1995
		EP 0722497 A	24-07-1996
		JP 9500026 T	07-01-1997
		WO 9528482 A	26-10-1995
WO 9615265 A	23-05-1996	US 5643726 A	01-07-1997
		AU 4462196 A	06-06-1996
		CA 2204871 A	23-05-1996
		EP 0791077 A	27-08-1997
		JP 10509321 T	14-09-1998
EP 874049 A	28-10-1998	FR 2762327 A	23-10-1998