

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 10.04.97.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.10.98 Bulletin 98/42.

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

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : HAROSH ITZIK — FR.

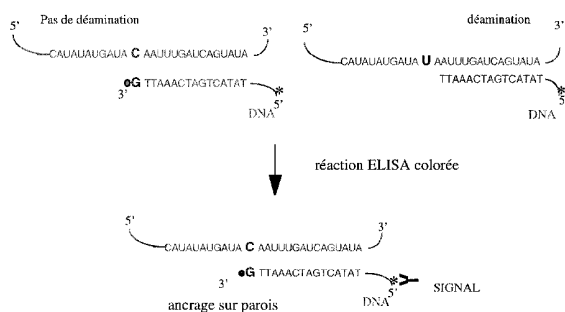
72 Inventeur(s) : HAROSH ITZIK.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) :

54 UTILISATION D'APOBEG1 OU DES PROTEINES ASSOCIEES, OU DES GENES RESPONSABLES DE LA
MALADIE D'ANDERSONS COMME CIBLE DE TRAITEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE ET DE L'OBESITE ET
TECHNIQUES ASSOCIEES DE CLONAGE ET DE CRIBLAGE D'INHIBITEURS.

57 La présente invention concerne une technique per-
mettant le criblage sensible, efficace et rapide de molécules
susceptibles d'inhiber l'activité déaminase d'une enzyme au
niveau d'une cytidine ou d'une cytidine méthylée en position
5 dans un ARN ou un ADN (schéma).



La présente invention concerne une technique de détection de la déamination d'une cytidine dans un ARN ou un ADN (par exemple un ARNm simple brin, ou ARN viral double brin, etc.). Cette technique repose sur la connaissance de la séquence locale de l'ARN ou de l'ADN contenant le site déaminé. Cette séquence est utilisée pour créer un oligonucléotide amorce (ADN ou ARN) juste en 3' du site déaminé (s'arrêtant en 3' du site déaminé à un site tel que la séquence intermédiaire ne comporte qu'un, deux ou trois types de nucléotides). Cette amorce est marquée par exemple à l'extrémité 5' ou à proximité, notamment par incorporation de nucléotides modifiés (biotinilés, radiomarqués, fluorescents, etc.), ou par modification chimique de cette extrémité, de façon à ce que ladite extrémité puisse être détectée, soit par réaction chimique, biochimique ou autre, notamment avec un substrat, soit par détection de fluorescence, radioactivité, etc. Un exemple d'un tel système de détection est donné par le système SPA® (Scintillation Proximity Assay) couplé à des amorces d'ADN, commercialisé par Amersham.

Cette amorce est hybridée avec l'ARN ou l'ADN à étudier en présence de Reverse Transcriptase (cas d'une hybridation ARN/ADN), d'ARN polymérase (cas d'une hybridation ARN/ARN) ou d'ADN polymérase (cas d'une hybridation ADN/ADN) et d'adénine modifiée. Dans le cas où le site étudié est déaminé (cas normal: non déaminé), un à trois nucléotides seront ajoutés à chaque amorce hybridée à un ARN ou ADN déaminé. Inversement, pour détecter l'absence de déamination d'un site (cas normal: déaminé), on utilisera de la guanine modifiée (par exemple biotinilée, radiomarquée, fluorescente, etc.).

Après extension des amorces, celles-ci seront dénaturées et mises en présence du système de révélation, soit des nucléotides modifiés à incorporer, soit des extrémités d'amorce, afin de détecter et/ou quantifier l'incorporation des nucléotides modifiés.

Un exemple de réalisation d'un tel système consistera en une amorce contenant un ou plusieurs nucléotide(s) digoxygéné(s) à son extrémité 5' ou à proximité, et dans lequel le nucléotide incorporé sera biotinilé. Après incorporation, l'ensemble amorce+nucléotide incorporé (amorce étendue) sera piégé dans un puits traité à la streptavidine, qui sera rincé pour éliminer les amorces non-étendues, et révélé par une technique standard d'ELISA (voir figure 1). Le système symétrique, où le nucléotide incorporé est digoxygéné, et l'extrémité 5' biotinilée sera utilisé aussi avantageusement. On pourra également, au lieu de marquer par exemple l'extrémité 5' de l'amorce utilisée, marquer l'ADN ou l'ARN étudié contenant le nucléotide susceptible d'être déaminé (voir figure 2).

La présente invention concerne aussi une technique permettant la détection de la déamination de cytidine méthylée (5mC) dans un ARN ou un ADN. Cette technique repose sur la connaissance de la séquence locale de l'ARN ou de l'ADN contenant le site déaminé. Cette séquence est utilisée pour créer un oligonucléotide amorce (ADN ou ARN) juste en 3' du site déaminé (s'arrêtant en 3' du site déaminé à un site tel que la séquence intermédiaire ne comporte qu'un, deux ou trois types de nucléotides) (voir figure 1). Cette amorce est marquée

par exemple à l'extrémité 5' ou à proximité, notamment par incorporation d'un à trois nucléotide(s) modifié(s) (biotinilé, radiomarqué, fluorescent, etc.), ou par modification chimique de cette extrémité, de façon à ce que ladite extrémité puisse être détectée, soit par réaction chimique, biochimique ou autre, notamment avec un substrat, soit par détection de fluorescence, radioactivité, etc. Un exemple d'un tel système de détection a déjà été cité précédemment.

Cette amorce est hybridée avec l'ARN ou l'ADN à étudier en présence de Reverse Transcriptase (cas d'une hybridation ARN/ADN), d'ARN polymérase (cas d'une hybridation ARN/ARN) ou d'ADN polymérase (cas d'une hybridation ADN/ADN) et d'adénine modifiée.

10 Dans le cas où le site étudié est déaminé (cas normal: non déaminé), un nucléotide (au moins) sera ajouté à chaque amorce hybridée. Inversement, pour détecter l'absence de déamination d'un site (cas normal: déaminé), on utilisera de la guanine modifiée (par exemple biotinilée, radiomarquée, fluorescente, etc.).

Après extension des amorces, les produits de la réaction sont mis en présence du système de révélation, soit des nucléotides modifiés à incorporer, soit des extrémités d'amorce, afin de détecter et/ou quantifier l'incorporation des nucléotides modifiés.

Un exemple de réalisation d'un tel système consistera en une amorce contenant un ou plusieurs nucléotide(s) digoxygéné(s) à son extrémité 5' ou à proximité, et dans lequel le nucléotide incorporé sera biotinilé. Après incorporation, l'ensemble amorce+nucléotide incorporé (amorce étendue) sera piégé dans un puits traité à la streptavidine, qui sera rincé pour éliminer les amorces non-étendues, et révélé par une technique standard d'ELISA. Le système symétrique, où le nucléotide incorporé est digoxygéné, et l'extrémité 5' biotinilée sera utilisé aussi avantageusement. On pourra également, au lieu de marquer par exemple l'extrémité 5' de l'amorce utilisée, marquer l'ADN ou l'ARN étudié contenant le nucléotide susceptible d'être déaminé.

Cette invention porte sur un kit de détection de déamination d'un ARN ou d'un ADN contenant l'un au moins des éléments suivants:

- a) une amorce ARN ou ADN marquée,
- 30 b) un à trois nucléotides marqués,
- c) les réactifs et milieux nécessaires à l'extension de l'amorce,
- d) un système de détection de l'incorporation des nucléotides marqués.

La présente invention décrit une méthode rapide de criblage de molécules ayant une influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'une enzyme agissant sur un ARN (respectivement sur un ADN) spécifique et un dispositif permettant de la mettre en œuvre. Cette méthode (voir figures 1 et 2) consiste en l'utilisation d'un substrat d'ARN (respectivement d'ADN) contenant la séquence minimale autour de la cytosine déaminée nécessaire à l'observation d'une activité normale de l'enzyme déaminase. A ce substrat est ajouté un extrait brut de protéines de cellules dans lesquelles a lieu cette activité, des amorces d'ADN (ou

d'ARN) permettant la mise en œuvre de la technique décrite précédemment de détection de déamination d'une cytidine dans un ARN (respectivement dans un ADN) pour la cytosine étudiée, et des nucléotides modifiés (adénine pour la détection d'une déamination, guanine pour celle d'une non-déamination), plus une ou plusieurs molécules ou produits dont on veut tester l'influence inhibitrice.

La présente invention concerne également toutes les molécules ou produits ayant une influence inhibitrice sur l'activité de ladite enzyme ou des protéines associées, découverts par une des techniques décrites dans cette invention.

10

Cette invention s'applique notamment au criblage de molécules inhibitrices de l'activité de déamination d'apobec-1, ou de l'activité des protéines associées (Shah RR et al (1991) J. Biol. Chem., 16301-16304, Davies MS et al (1989) J. Biol. Chem., 13395-13398), susceptibles d'usage thérapeutique dans le cas de l'athérosclérose et de l'obésité, et autres maladies caractérisées notamment par un niveau de chylomicrons et/ou de VLDL dans le plasma supérieur à la normale (hyperlipidémies, comme par exemple hypercholestérolémie, hypertriglycémie, etc) et/ou par une hyperglycémie.

La cytidine déaminée étudiée est ici la cytidine en position 6666 de l'ARNm d'apoB, la séquence d'ARN utilisée comme substrat contenant la zone d'ancrage d'apobec-1 ou des protéines associées est telle que décrit dans la littérature (Shah RR et al (1991) J. Biol. Chem., 16301-16304, Davies MS et al (1989) J. Biol. Chem., 13395-13398) (notée séquence d'ancrage de l'ARNm d'apoB), et les extraits de protéines utilisés pourront provenir de foie de rat ou d'autres sources. La séquence utilisée comme amorce dans la mise en œuvre de la technique contient un nombre de nucléotides complémentaires de la séquence en 3' du site 6666 de l'ARNm d'apoB suffisant pour une hybridation correcte (au moins égal à 14 nucléotides).

Cette invention porte donc sur une technique de détection de la déamination de la cytidine en position 6666 de l'ARNm d'apoB comme précédemment décrit, et sur un kit de détection de déamination d'un ARN comportant la séquence d'ancrage de l'ARNm d'apoB, contenant l'un au moins des éléments suivants:

- a) une amorce ARN ou ADN marquée,
- b) un à trois nucléotides marqués,
- c) les réactifs et milieux nécessaires à l'extension de l'amorce,
- d) un système de détection de l'incorporation des nucléotides marqués.

La présente invention décrit aussi une technique rapide de criblage de molécules ayant une influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'apobec-1 qui repose sur la technique de détection de la déamination spécifique d'un ARN décrite précédemment, dans laquelle on utilise un substrat d'ARN contenant la séquence d'ancrage de l'ARNm d'ApoB. A ce substrat est

40

ajouté un extrait brut de protéines de cellules dans lesquelles a lieu cette activité, des amorces d'ADN (ou d'ARN) permettant la mise en œuvre de la technique décrite précédemment de détection de déamination d'une cytidine dans un ARN pour la cytidine étudiée, et des nucléotides modifiés (adénine pour la détection d'une déamination, guanine pour celle d'une non-déamination), plus une ou plusieurs molécules ou produits dont on veut tester l'influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'apobec-1.

La présente invention concerne toutes les molécules ou produits ayant une influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'apobec-1, ou des protéines associées, découverts par une ou plusieurs des techniques décrites dans cette invention.

LEGENDES DES FIGURES:

Figure 1: Criblage d'inhibiteurs de l'activité déaminase d'une enzyme à l'aide d'une technique de détection d'une déamination. Exemple d'apobec-1 et technique utilisant un système d'ELISA. La technique met en jeu une séquence d'ARN synthétique contenant la séquence d'ancrage (environ 50 nucléotides dans le cas d'apobec-1). Après l'incubation avec les inhibiteurs testés en présence de l'enzyme dans le milieu nécessaire, on ajoute une amorce complémentaire de la séquence en 3' du site déaminé de l'ARN, dont l'extrémité 5' est par exemple marquée à l'aide d'un ou plusieurs nucléotides modifiés (par exemple digoxygénés) dans des conditions d'hybridation. On ajoute alors l'enzyme Reverse Transcriptase et des nucléotides modifiés, par exemple biotinilés (uniquement biot-dGTP dans l'exemple figuré). En cas de déamination, aucune incorporation n'a lieu. En cas d'activité de l'inhibiteur (pas de déamination), l'incorporation d'un nucléotide biotinilé a lieu. Il est donc possible de piéger les amorces allongées d'un nucléotide biotinilé sur un support couvert de streptavidine, et de révéler la présence de digoxygénine par un système d'anti-digoxygénine suivi d'une réaction ELISA.

Figure 2: Criblage d'inhibiteurs de l'activité déaminase d'une enzyme à l'aide d'une technique de détection d'une déamination. Exemple d'apobec-1 et technique utilisant le système SPA®. La technique met en jeu une séquence d'ARN synthétique contenant la séquence d'ancrage (environ 50 nucléotides dans le cas d'apobec-1) couplée à une bille SPA®. Après l'incubation avec les inhibiteurs testés en présence de l'enzyme dans le milieu nécessaire, on ajoute une amorce complémentaire de la séquence en 3' du site déaminé de l'ARN dans des conditions d'hybridation. On ajoute alors l'enzyme Reverse Transcriptase et des nucléotides radiomarqués (uniquement d³HGTP dans l'exemple figuré). En cas de déamination, aucune incorporation n'a lieu et le signal détecté ne se distingue pas du bruit de fond. En cas d'activité de l'inhibiteur

(pas de déamination), l'incorporation d'un nucléotide radiomarké a lieu, et un signal est détecté.

5

EXEMPLES:

Exemple 1: technique de criblage de molécules susceptibles d'inhiber l'activité déaminase d'apobec-1 à l'aide d'un système de révélation ELISA coloré.

10

L'exemple utilise une séquence d'ARN synthétique contenant la séquence d'ancrage d'apobec-1 (environ 50 nucléotides (Shah RR et al (1991) J. Biol. Chem., 16301-16304, Davies MS et al (1989) J. Biol. Chem., 13395-13398)) disposée dans une plaque de 96 puits. Après l'incubation avec les inhibiteurs testés en présence de l'enzyme dans le milieu nécessaire, on

15 ajoute une amorce complémentaire de la séquence en 3' du site déaminé de l'ARN, dont l'extrémité 5' est par exemple préalablement marquée à l'aide d'un (ou plusieurs) nucléotide(s) digoxygéné(s) (dig 11-dUTP, commercialisé par la société Boehringer Mannheim) dans des conditions d'hybridation. On ajoute alors l'enzyme Reverse Transcriptase et des nucléotides

20 modifiés, par exemple biotinilés (biot-dGTP, dans l'exemple illustré sur la figure 1) disponibles soit commercialement, soit réalisables sans difficulté à l'aide de kits de biotinylation (commercialisé par exemple par la société Sigma). En cas de déamination, c'est-à-dire d'activité non inhibée de l'enzyme apobec-1, aucune incorporation de nucléotide biotinilé n'a lieu. En cas

25 d'activité de l'inhibiteur (pas de déamination), l'incorporation d'un nucléotide biotinilé peut avoir lieu. A l'issue de cette réaction, il est donc possible de piéger les amorces allongées d'un nucléotide biotinilé sur les parois couvertes de streptavidine de la plaque de 96 puits utilisée, et de se débarrasser des amorces non étendues par lavage. La révélation de la présence de digoxygénine s'effectue alors à l'aide d'un système d'anticorps anti-digoxigénine suivi d'une

30 réaction ELISA, par exemple antidig-alkaline-phosphatase révéle par réaction avec des sels de nitrobleu tetrazolium (NBT). Les systèmes digoxigénine et anticorps correspondants sont commercialisés par exemple par la société Boehringer Mannheim.

Exemple 2: technique de criblage de molécules susceptibles d'inhiber l'activité déaminase d'apobec-1 à l'aide du système SPA®.

35 L'exemple utilise une séquence d'ARN synthétique contenant la séquence d'ancrage d'apobec-1 (environ 50 nucléotides (Shah RR et al (1991) J. Biol. Chem., 16301-16304, Davies MS et al (1989) J. Biol. Chem., 13395-13398)) couplée à une bille SPA® (système commercialisé par la société Amersham) disposée dans une plaque de 96 puits. Après l'incubation avec les inhibiteurs testés en présence de l'enzyme dans le milieu et avec les réactifs nécessaires, on

40 ajoute une amorce complémentaire de la séquence en 3' du site déaminé de l'ARN dans des

conditions d'hybridation (Maniatis T et al (1982) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY). On ajoute alors une enzyme Reverse Transcriptase et des nucléotides radiomarqués (uniquement d³HGTP dans l'exemple illustré sur la figure 2). Dans le cas présent, il serait également possible d'utiliser d³HTTP en plus. En cas de déamination, c'est-à-dire une activité normale de l'enzyme apobec-1, aucune incorporation n'a lieu et le signal détecté, dû à la scintillation de proximité des billes SPA, ne se distingue pas du bruit de fond. En cas d'activité de l'inhibiteur, l'activité de déamination par apobec-1 est diminuée, rendant possible l'incorporation d'un nucléotide radiomarqué (ou deux si d³HTTP est également utilisé) à l'extrémité 3' d'une partie des amorces hybridées. Dans ce cas, un signal de scintillation peut être détecté qui se distingue du bruit de fond.

REVENDICATIONS

1. Technique de détection de la déamination d'une cytidine ou d'une 5-méthyl cytidine dans un ARN ou un ADN, caractérisée en ce que l'on utilise une amorce d'ARN ou d'ADN d'au moins 14 nucléotides.
2. Technique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on utilise un ARN ou un ADN modifié et de un à trois nucléotides marqués pour l'extension de l'amorce.
3. Technique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on utilise une amorce ARN ou ADN marquée et un à trois nucléotides marqués différemment de l'amorce.
4. Technique selon les revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'on utilise un ARN comprenant la séquence d'ancrage de l'ARNm du gène apoB.
5. Kit de détection de déamination d'un ARN ou d'un ADN contenant l'un au moins des éléments suivants:
- a) une amorce ARN ou ADN marquée,
 - b) un à trois nucléotides marqués,
 - c) les réactifs et milieux nécessaires à l'extension de l'amorce,
 - d) un système de détection de l'incorporation des nucléotides marqués, utilisé suivant l'une des revendications 1 à 4.
6. Technique de criblage de molécules ayant une influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'une enzyme, caractérisée en ce qu'elle utilise l'une des techniques selon les revendications 1 à 5.
7. Dispositif de criblage de molécules ayant une influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'une enzyme, contenant l'un au moins des éléments suivants:
- a) réactifs et milieux nécessaires à l'activité de l'enzyme,
 - b) kit de détection de déamination d'un ARN ou d'un ADN suivant l'une des revendications 1 à 6.
8. Molécule ou produit ayant une influence inhibitrice sur l'activité déaminase d'une enzyme, caractérisé en ce qu'il a été détecté grâce à un des procédés décrits dans les revendications 1 à 7.

1/2

Détection de l'activité déaminase d'une enzyme par ELISA

Incubation d'apobec-1 avec un ARN synthétique et des produits à tester

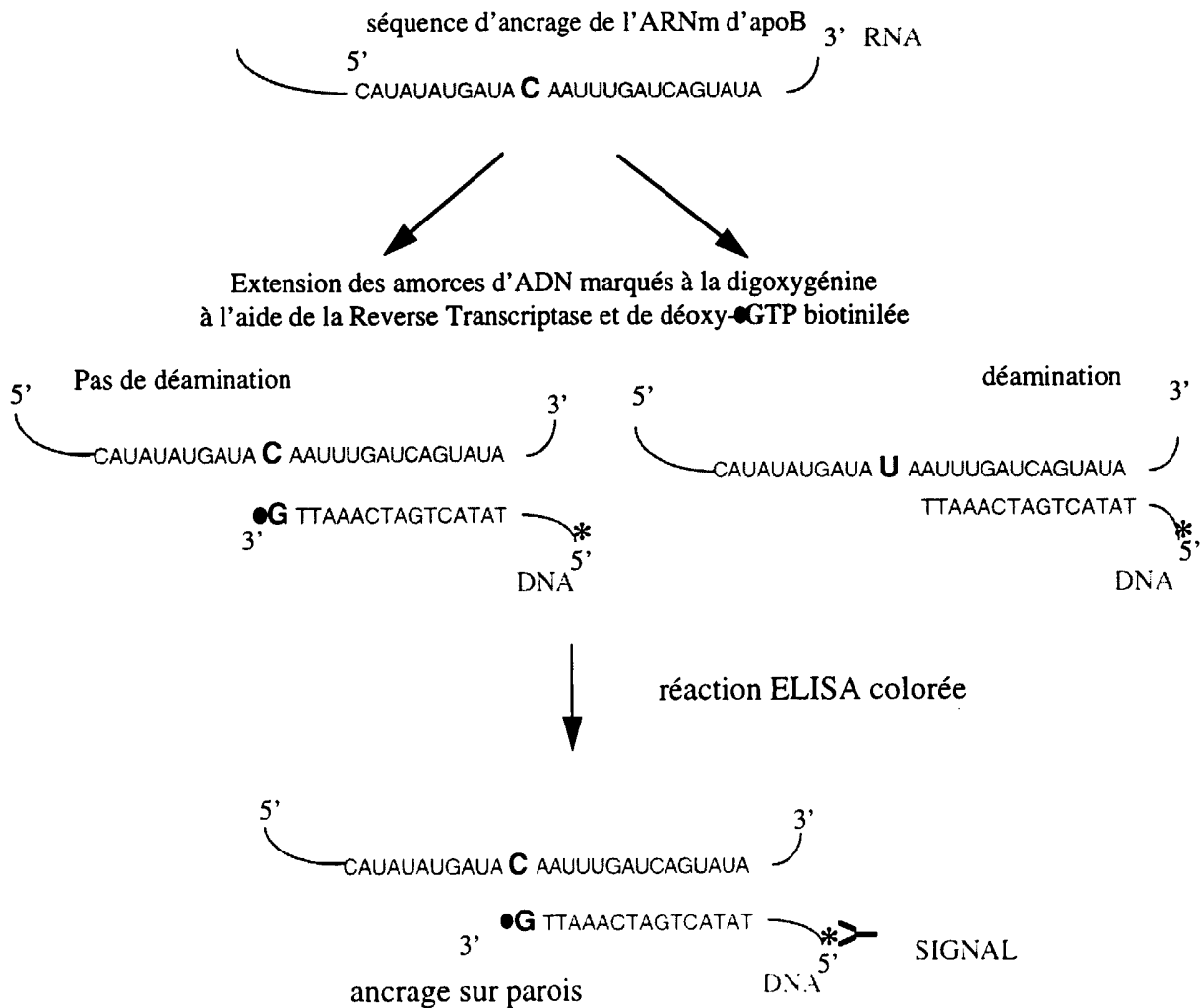


Figure 1/2

2/2

Détection de l'activité déaminase d'une enzyme par billes SPA

Incubation d'apobec-1 avec de l'ARN synthétique
et les produits à tester

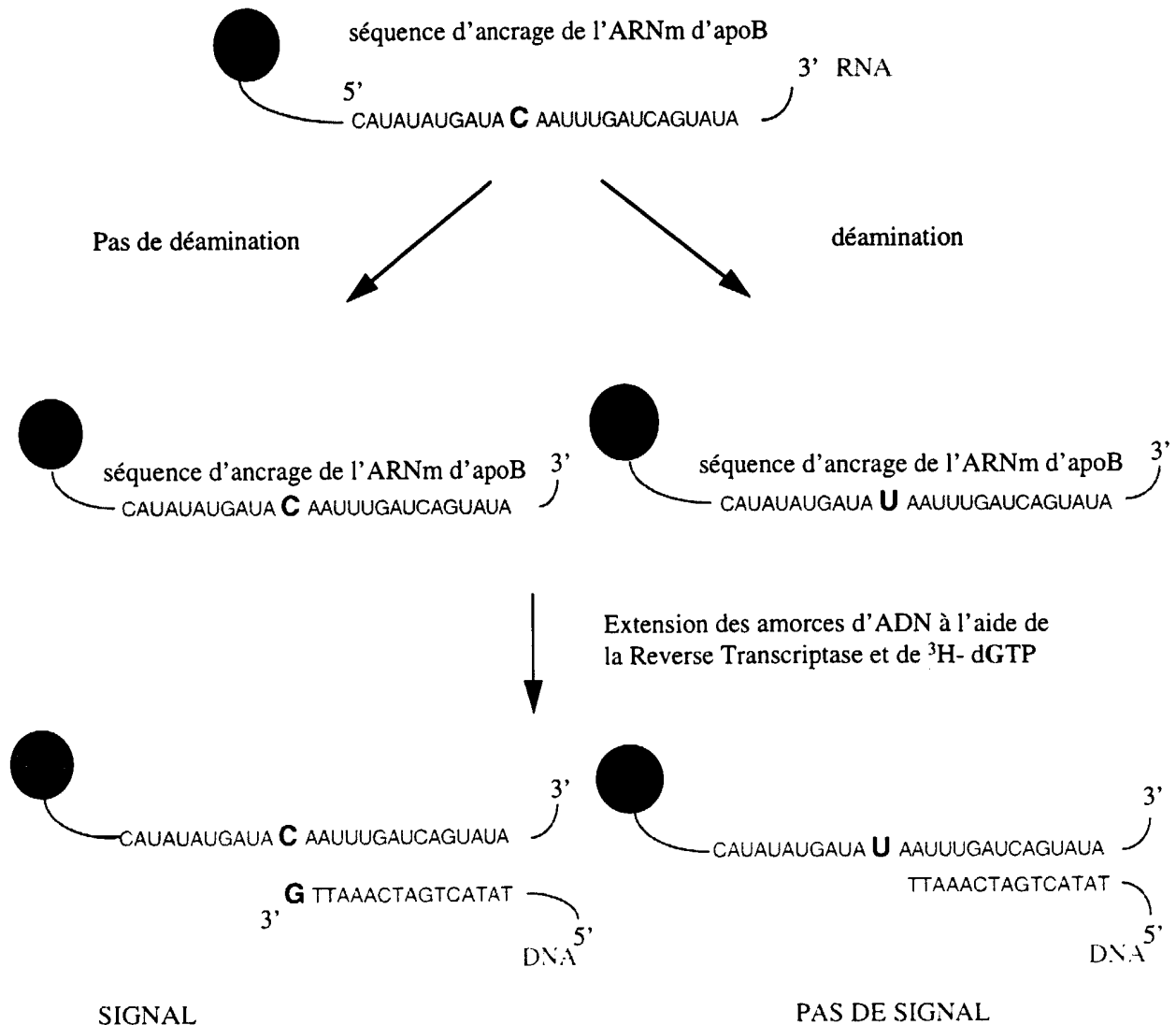


Figure 2/2

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 544594
FR 9704388

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A,D	R.R. SHAH ET AL: "Sequence requirements for the editing of apolipoprotein B in mRNA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 25, 5 septembre 1991, BETHESDA MD USA, pages 16301-16304, XP002051487 * le document en entier *	1-8
A,D	M.S. DAVIES ET AL.: "Sequence requirements for apolipoprotein B RNA editing in transfected rat hepatoma cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 23, 15 août 1989, BETHESDA MD USA, pages 13995-13398, XP002051488 * le document en entier *	1-8
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 102, no. 10, 1996 Philadelphia, PA, US; abstract no. 146673, XP002051489 * abrégé * & S. VINCENZETTI ET AL.: "Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification and characterization." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 8, no. 2, 1996, WASHINGTON DC USA, pages 247-253, -----	1-8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 janvier 1998		Van Bohemen, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)