

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 30.12.97.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 02.07.99 Bulletin 99/26.

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.

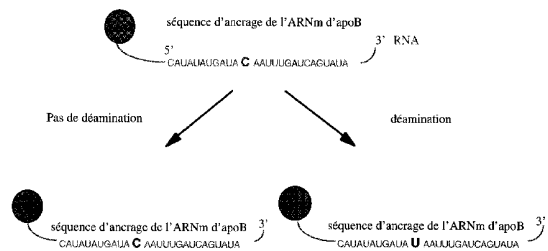
72) Inventeur(s) : HAROSH ITZIK.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) :

54) CIBLE DE TRAITEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE, DE L'OBESITE ET DU DIABETE DE TYPE II.

57) La présente invention concerne l'utilisation de la protéine apobec-1 ou des protéines associées pour le traitement de l'athérosclérose et de l'obésité, du diabète de type II (non-insuline dépendant), ou autres maladies caractérisées notamment par une hyperlipidémie et/ ou par une hyperglycémie, due par exemple à un niveau de chylomicrons et/ ou de VLDL dans le plasma supérieur à la normale. Cette invention concerne également le clonage du ou des gènes de la maladie d'Anderson comme cible pour le traitement de l'athérosclérose, de l'obésité, du diabète de type II (non-insuline dépendant), ou autres maladies caractérisées notamment par une hyperlipidémie et/ ou par une hyperglycémie.



FR 2 773 079 - A1



Cette invention concerne l'enzyme apobec-1 et les protéines associées qui permettent la production de la protéine apoB48 dans l'intestin. L'invention porte notamment sur une méthode de détection d'inhibiteurs d'apobec-1 et des protéines associées, sur l'utilisation du ou des gène(s) de la maladie d'Anderson comme cible pour un traitement de l'athérosclérose, de l'obésité, du diabète de type II (non-insuline dépendant), ou 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, hypertriglycéridémie, etc) et/ou par une hyperglycémie.

Le gène apoB code pour deux protéines, apoB100 et apoB48. Ces deux protéines sont traduites à partir du même ARN messenger, modifié au niveau d'un unique nucléotide par une enzyme spécialisée, apobec-1 (pour: apoB editing compound 1) et des protéines associées. Dans le système digestif de l'homme, cette enzyme est exprimée dans l'intestin mais pas dans le foie. Dans l'intestin, elle modifie le codon 6666 de l'ARN messenger d'apoB en créant un codon stop, qui aboutit à la production d'un polypeptide nommé apoB48 (pour 48 % de l'ARN messenger traduit). ApoB48 est essentielle pour la formation des chylomicrons, qui servent à l'absorption et au transport du cholestérol, des triglycérides et autres lipides en provenance de l'intestin. Dans le foie, où l'enzyme apobec-1 n'est pas exprimée, et où aucune modification de l'ARN messenger d'apoB n'a lieu, la protéine produite est apoB100, qui fait partie des lipoprotéines de très faible densité (VLDL, Very Low Density Lipoproteins) et de faible densité (LDL, Low Density Lipoproteins).

Il existe actuellement trois maladies génétiques humaines qui affectent le niveau d'expression d'apoB, toutes ayant des phénotypes similaires: l'abétalipoprotéïnémie, l'hypobétalipoprotéïnémie et la maladie d'Anderson, également appelée maladie de la rétention de chylomicrons. L'abétalipoprotéïnémie est due à une déficience en MTP (Microsomal Transfert Protein), alors que l'hypobétalipoprotéïnémie est due à des mutations multiples du gène apoB. Dans ces deux cas, aucun VLDL ni chylomicron n'est détectable dans le plasma, associé respectivement à l'absence d'apoB100 et d'apoB48.

Par contre, dans la maladie d'Anderson, seuls manquent dans le plasma les chylomicrons (apoB48), tandis que les VLDL (apoB100) restent détectables.

Dans cette invention, il est suggéré:

1. que l'enzyme apobec-1 et ses protéines associées sont des cibles potentielles pour le traitement 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, hypertriglycéridémie, etc) et/ou par une hyperglycémie.
2. que le ou les gène(s) responsable(s) de la maladie d'Anderson sont des cibles potentielles pour le traitement 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, hypertriglycéridémie, etc, et/ou par une hyperglycémie.

3. que le gène apobec-1 ou les gènes codant pour les protéines associées sont des gènes candidats pour la maladie d'Anderson.

5

La protéine apoB humaine est la principale apolipoprotéine des lipoprotéines riches en triglycérides (présentes dans les VLDL, LDL et chylomicrons). Son gène est exprimé à la fois dans l'intestin et dans le foie. Le foie produit une protéine de 4536 acides aminés appelée apoB100, tandis que dans l'intestin, le même gène code pour une protéine plus petite qui  
10 contient 2152 acides aminés, appelée apoB48. Cette protéine est identique à la partie N-terminale de l'apoB100. ApoB48 est le résultat de la traduction de l'ARN messager (ARNm) d'apoB modifié post-transcriptionnellement par l'enzyme apobec-1 (protéine d'édition de l'ARN messager d'apoB) au niveau du nucléotide 6666 (cytidine), qui subit une déamination donnant une uridine. Cette modification de l'ARN messager d'apoB crée un codon stop (UAA)  
15 (voir figure 1 et Chan L (1995) Biochimie, 75-78).

Chez l'homme et le rat, l'ADN complémentaire (ADNc) qui code pour apobec-1 a été cloné et séquencé récemment (Teng B et al (1993) Science, 1816-1819, Lau PP (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8522-8526). Chez l'homme, ce gène est exprimé uniquement dans le petit intestin, seul endroit où sont produits apoB48 et les chylomicrons. Dans le foie humain,  
20 aucune production d'apoB48 n'a lieu, ce qui est cohérent avec l'absence d'observation de l'enzyme apobec-1 dans cet organe. Au contraire, chez le rat, chez qui apoB100 et apoB48 sont produites dans le foie et l'intestin, apobec-1 est exprimée dans les deux organes, ce qui suggère un rôle essentiel de cette protéine dans la production d'apoB48 (Giannoni et al (1994) J. Biol. Chem., 5932-5936). Par ailleurs, il a été montré par les mêmes auteurs que la transfection de  
25 cellules hépatiques HepG2 avec un ADNc d'apobec-1 conduit à une modification de l'ARNm endogène d'apoB, et à la sécrétion de la protéine apoB48 (Giannoni et al (1994) J. Biol. Chem., 5932-5936).

Enfin, il a été démontré récemment que des souris transgéniques knock-out pour le gène apobec-1 perdent l'activité d'apobec-1, et ne possèdent aucune trace d'apoB48 dans la  
30 circulation sanguine (Hirano KI et al (1996) J. Biol. Chem. 7154-7159, Morrison JR et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9887-9890).

Trois maladies humaines d'origine génétique possédant un phénotype semblable ont été décrites: l'abétalipoprotéïnémie, l'hypobétalipoprotéïnémie et la maladie d'Anderson, également appelée maladie de la rétention de chylomicrons (tableau 1 et Havel RJ and Kane JB (1995) in  
35 The metabolic and molecular basis of inherited disease). La cause génétique de deux de ces maladies, l'abétalipoprotéïnémie et l'hypobétalipoprotéïnémie a été élucidée. Dans le cas de l'abétalipoprotéïnémie, une mutation "frameshift" a été décrite dans le gène de la protéine MTP (Microsomal Triglyceride Transfert) qui conduit à une absence totale de cette protéine et de son activité. Cette mutation empêche par conséquent la formation et la sécrétion de lipoprotéines  
40 contenant apoB, et donc, la détection d'apoB100 et d'apoB48 dans le plasma des patients

(Sharp D et al (1993) *Nature*, 65-69, Wetterau JR et al (1992) *Science*, 999-1001). L' hypobétalipoprotéïnémie est une maladie dans laquelle différentes mutations dans le gène apoB ont été décrites, conduisant à des protéines apoB tronquées, de différentes tailles. A présent, 25 mutations différentes (nonsense ou frameshift) à l'origine de l'hypobétalipoprotéïnémie ont été décrites, résultant en un codon stop prématuré (Linton MF et al (1993) *J. Lipid Res.*, 521-541, Rosseneu M and Lauber C (1995) *FASEB J.*, 768-776). Le mécanisme par lequel ces troncatures de la protéine apoB conduisent à l'hypobétalipoprotéïnémie est encore inconnu. Dans le cas de l'abétalipoprotéïnémie et de l'hypobétalipoprotéïnémie, l'absence d'absorption de chylomicrons conduit également à l'absence d'absorption de vitamine E, créant des symptômes neurologiques sévères.

La troisième de ces maladies génétiques aux phénotypes similaires, la maladie de rétention des chylomicrons, décrite pour la première fois par Anderson, il y a 36 ans (Anderson CM et al (1961) *Med. J. Aust.*, 617-621) reste toujours une énigme. Cette affection est caractérisée par des diarrhées chroniques, une absorption des graisses déficiente, et un manque de vigueur. Dans certains cas, des symptômes neurologiques dus à l'absence de vitamine E ont été observés, mais ceux-ci sont moins sévères que dans le cas de l'abétalipoprotéïnémie et de l'hypobétalipoprotéïnémie (Havel RJ and Kane JB (1995) in *The metabolic and molecular basis of inherited disease*). Cette pathologies semble être héritée de façon autosomale récessive. Enfin, l'analyse du plasma des patients montre une absence totale de chylomicrons et de la protéine apoB48 (Havel RJ and Kane JB (1995) in *The metabolic and molecular basis of inherited disease*).

Des études de liaisons génétiques par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont montré que le gène apoB n'est pas impliqué dans la maladie d'Anderson (Pessah M et al (1991) *J. Clin. Invest.*, 367-370, Stritch D et al (1993) *J. Pediatric Gastro. Nutrit.*, 257-264). Chez les patients atteints de la maladie d'Anderson, l'activité de la MTP est normale, ce qui suggère qu'un gène différent est impliqué dans cette maladie (Linton MF et al (1993) *J. Lipid Res.*, 521-541). Ces expériences ainsi que d'autres suggèrent donc que l'origine de la maladie d'Anderson n'est pas liée à un problème de sécrétion via la MTP, et que la rétention des chylomicrons met en jeu un autre mécanisme (Wetterau JR (1992) *Science*, 999-1001).

Il est proposé dans cette invention, que le gène de la protéine apobec-1 est un candidat pour la maladie d'Anderson pour les raisons suivantes:

1. apobec-1 est exprimée exclusivement dans l'intestin.
2. apoB48 et les chylomicrons sont absents du plasma des patients atteints de la maladie d'Anderson, tandis que les VLDL contenant apoB100 y sont présents. Ceci constitue le phénotype principal des patients atteints de la maladie d'Anderson.
3. des souris knock-out pour le gène apobec-1 perdent l'activité apobec-1 et la modification de l'ARNm qui conduit d'ordinaire à la protéine apoB48, conduisant à l'absence de cette protéine dans le plasma (Hirano KI et al (1996) *J. Biol. Chem.* 7154-7159, Morrison JR et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9887-9890).

4. des rats obèses Zucker ont une activité d'apobec-1 supérieure de 42 % à celle de rats témoins non obèses, avec pour conséquence un niveau de chylomicrons et d'apoB48 dans le sang 4.7 fois supérieur à celui des rats témoins (Phung TL et al (1996) *Metabolism*, 1056-1058).

5 5. Il a par ailleurs été proposé que la maladie d'Anderson soit due à une modification dans d'autres gènes impliqués dans la voie de sécrétion ou de glycosylation des protéines (Levy E et al (1987) *J. Lipid Res.*, 1263-1274). Leurs résultats montrent de surcroît clairement qu'un patient atteint par la maladie d'Anderson sur les trois étudiés a un taux élevé d'apoB100 et relativement peu d'apoB48. En utilisant un système de détection plus sensible, marquage radioactif suivi d'une analyse par SDS-PAGE par exemple, on détecte  
10 chez les deux autres patients une quantité visible d'apoB100. La présence probable d'apoB48 parmi d'autres bandes visibles de protéines plus petites qu'apoB100 pourrait être expliquée par une dégradation d'apoB100.

15 Enfin, il a été montré qu'une mutation dans la séquence d'ancrage autour du site de déamination de l'ARNm d'apoB (site 6666) peut entraîner une diminution voire une perte de l'édition de ce site (Shah RR et al (1991) *J. Biol. Chem.*, 16301-16304). Il n'est donc pas exclu que la maladie d'Anderson soit un cas particulier de l'hypobétalipoprotéïnémie dont certaines mutations du gène apoB100 affectent uniquement la formation et la sécrétion des  
20 chylomicrons, tandis que la formation et la sécrétion des VLDL ne sont pas affectées.

La présente invention suggère donc qu'une mutation ou autre modification de la séquence d'ancrage autour du site de déamination de l'ARNm d'apoB peut être à l'origine de la maladie d'Anderson.

Pour tester l'hypothèse que le gène apoB est un candidat pour la maladie d'Anderson, la  
25 présente invention propose de séquencer par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) notamment, l'ARNm d'apoB de biopsies intestinales de patients souffrant de la maladie d'Anderson, autour de la séquence d'ancrage entourant le site 6666, et d'étudier le degré de déamination (conversion C → U) de ce site. Si aucune mutation ou modification de la séquence d'ancrage entourant le site de déamination n'est observée, cela indiquera une forte  
30 présomption que l'origine de la maladie d'Anderson est due à apobec-1 ou les protéines associées.

Pour tester l'hypothèse que le gène de la protéine apobec-1 est à l'origine de la maladie d'Anderson, la présente invention propose de recloner et séquencer le gène apobec-1 chez les patients. Pour tester l'hypothèse que le gène de la protéine ABBP-1 (Apobec-1 Binding  
35 Protein), seule protéine associée à apobec-1 clonée à présent (Lau PP et al (1997) *J. Biol. Chem.*, 1452-1455), est à l'origine de la maladie d'Anderson, la présente invention propose de recloner et séquencer le gène ABBP-1 chez les patients, afin de détecter d'éventuelles différences avec le génotype normal. Dans le cas où d'autres protéines associées à apobec-1 viendrait à être clonées, la présente invention propose d'adopter la même technique pour tester  
40 l'hypothèse qu'elles sont à l'origine de la maladie d'Anderson.

Dans le cas où la maladie d'Anderson ne serait pas due à une modification de la séquence d'apoB, ni de celles de la protéine apobec-1 et de ses protéines associées connues et clonées, la présente invention propose de réaliser le clonage du ou des gène(s) responsable(s) par une technique d'hybridation soustractive comme décrit dans l'exemple 1 (Kaneko-Ishino T (1995) Nature Genet., 52-59) ou une technique de clonage par détection de mutations ponctuelles à l'aide de la protéine mutS, comme décrit dans l'exemple 2.

Cette invention concerne aussi des molécules inhibitrices d'apobec-1, ou des protéines associées, 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, hypertriglycéridémie, etc) et/ou par une hyperglycémie, obtenues à l'aide d'une technique de détection de déamination d'une cytidine dans un ARN (demande de brevet d'invention n° 97 04388) comme décrit dans l'exemple 3. 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), 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 (supérieur ou égal à 14 nucléotides).

La présente invention porte donc sur l'utilisation du gène de l'enzyme apobec-1, ou du gène de la protéine ABBP-1 ou de celui d'une protéine associée à l'enzyme apobec-1, ou encore d'un gène impliqué dans la maladie d'Anderson, pour la recherche et la fabrication de molécules ou agents thérapeutiques inhibant l'expression d'un ou plusieurs de ces gènes ou l'activité des enzymes ou protéines exprimées par ces gènes.

La présente invention porte également sur l'utilisation des molécules ou agents thérapeutiques découverts et fabriqués selon la revendication précédente pour la prévention, la stabilisation ou le traitement de l'athérosclérose, de l'obésité, du diabète de type II (non-insuline dépendant), ou autres maladies caractérisées notamment par une hyperlipidémie, comme par exemple une hypercholestérolémie, une hypertriglycéridémie, etc, et/ou par une hyperglycémie, due par exemple à un niveau de chylomicrons et/ou de VLDL dans le plasma supérieur à la normale.

La présente invention concerne donc également toute molécule ou agent thérapeutique permettant une inhibition de l'activité de ces enzymes ou protéines, ou de l'expression de ces gènes.

Cette invention concerne notamment l'utilisation de molécules anti-sens d'acide nucléique pouvant réduire la quantité d'apobec-1 ou des protéines associées, ou la quantité de protéines exprimés par le ou les gène(s) de la maladie d'Anderson ou tout gène impliqué dans la formation, la stabilisation, la sécrétion, la glycosilation ou le transport des chylomicrons et/ou de VLDL (Uhlmann E and Peyman A (1990) Chem. Rev., 543-584). De telles molécules anti-sens peuvent se lier de façon covalente ou non à l'ADN ou à l'ARN de l'apobec-1 ou des protéines associées, ou à l'ADN ou à l'ARN du ou des gènes responsable(s) de la maladie d'Anderson ou de tout gène impliqué dans la formation, la stabilisation, la sécrétion, la glycosilation ou le transport des chylomicrons et/ou de VLDL. Par exemple, une telle liaison de molécule anti-sens peut cliver ou faciliter le clivage de l'ADN ou ARN, d'apobec-1, ou des protéines associées, ou du ou des gène(s) responsable(s) de la maladie d'Anderson ou de tout gène impliqué dans la formation, la stabilisation, la sécrétion, la glycosilation ou le transport des chylomicrons et/ou de VLDL. Une telle liaison de molécule anti-sens peut également augmenter la dégradation de l'ARNm nucléaire ou cytoplasmique correspondant, ou inhiber sa traduction, la fixation de facteurs de transcription ou d'ARN pré-messager, ou bien encore par exemple inhiber l'épissage de l'ARN pré-messager. L'ensemble de ces modes d'action de molécules anti-sens ont pour effet la diminution de l'expression du gène d'apobec-1, ou des protéines associées, ou du ou des gène(s) responsable(s) de la maladie d'Anderson ou de tout gène impliqué dans la formation, la stabilisation, la sécrétion, la glycosilation ou le transport des chylomicrons et/ou de VLDL, ce qui en fait un mode de traitement important de l'obésité, du diabète de type II (non-insuline dépendant ou de l'athérosclérose, par exemple.

Parmi les cibles potentielles de telles molécules anti-sens, on pourra citer sans pour autant s'y limiter les séquences du gène d'apobec-1, ou des protéines associées, ou du ou des gène(s) responsable(s) de la maladie d'Anderson ou de tout gène impliqué dans la formation, la stabilisation, la sécrétion, la glycosilation ou le transport des chylomicrons et/ou de VLDL, mais également les séquences en 3' et 5' de ces gènes qui pourraient être des régions de contrôle de ces gènes.

La présente invention concerne donc également des molécules anti-sens d'acide nucléique simple brin (ADN ou ARN) d'au moins 12 nucléotides agissant sur le gène ou son ARN, ou sur une région régulatrice de l'expression du gène permettant une inhibition de l'expression du gène de l'enzyme apobec-1, ou du gène de la protéine ABBP-1 ou de celui d'une protéine associée à l'enzyme apobec-1, ou encore d'un gène impliqué dans la maladie d'Anderson ou de l'activité des enzymes ou protéines exprimées par ces gènes.

35

#### LEGENDES DES FIGURES:

Tableau 1: Trois maladies génétiques possédant des phénotypes similaires. Dans le cas de l'abétalipoprotéïnémie, la MTP est mutée, conduisant à l'absence de particules contenant

40

apoB100 ou apoB48 dans le sang. Dans le cas de l'hypobétalipoprotéïnémie, le gène apoB est muté, avec pour résultat un niveau très bas de VLDL et de chylomicrons. La maladie d'Anderson se caractérise par l'absence d'apoB48 uniquement, ayant pour conséquence l'absence de chylomicrons à un niveau détectable dans le sang.

5

Figure 1: Expression d'apoB. Le gène apoB est exprimé dans le foie et l'intestin. Dans le foie, l'ARNm d'apoB est traduit en apoB100, alors que dans l'intestin, le codon CAA commençant à la position 6666 (indiquée par un astérisque) dans l'ARNm est édité par l'enzyme apobec-1, qui déamine la cytidine en uracyl, donnant un codon stop aboutissant à la formation de la

10

Figure 2: Clonage du ou de(s) gène(s) de la maladie d'Anderson par hybridation soustractive. La première étape de la technique consiste à isoler des cellules enterocytes provenant de l'intestin d'un patient et d'un individu normal. On procède ensuite à la synthèse de brins

15 d'ADN complémentaires des ARNm extraits de ces cellules, à l'aide de l'enzyme Reverse Transcriptase. A la fin de la synthèse d'un second brin d'ADN complémentaire de cet ADN à l'aide de l'ADN polymérase, des bouts francs sont créés. Ceci permet la ligation d'une rallonge constituée d'une vingtaine de paires de base à chaque extrémité. On utilise deux séquences différentes pour le patient (rallonge-A) et pour l'individu normal (rallonge-N). L'ADNc ainsi

20 récupéré est amplifié par PCR en utilisant comme amorces les séquences correspondant aux deux rallonges A et N, l'amorce correspondant au patient étant biotinillée par exemple. L'ADNc ainsi modifié des deux individus est alors mélangé et mis dans des conditions de dénaturation et réassociation. L'ADNc hybridé est mis en présence de billes magnétiques couvertes de streptavidine, ce qui permet finalement d'isoler en solution après plusieurs itérations, les ADNc

25 de l'individu normal correspondant au gène non transcrit chez le patient. Une amplification par PCR de ce gène à l'aide des amorces correspondant à la rallonge N.

25

Figure 3: Clonage du ou de(s) gène(s) de la maladie d'Anderson par utilisation de la protéine mutS. La première étape de la technique consiste à isoler des cellules enterocytes provenant de

30 l'intestin d'un patient et d'un individu normal. On procède ensuite à la synthèse de brins d'ADN complémentaires des ARNm extraits de ces cellules en quantité équivalente pour le patient et l'individu normal, à l'aide de l'enzyme Reverse Transcriptase. A la fin de la synthèse d'un second brin d'ADN complémentaire de cet ADN à l'aide de l'ADN polymérase, des bouts francs sont créés. Ceci permet la ligation d'une rallonge constituée d'une vingtaine de paires de

35 base à chaque extrémité. L'ADNc ainsi modifié des deux individus est alors mélangé et mis dans des conditions de dénaturation et réassociation. Au moment de l'hybridation la mutation ponctuelle dans le gène recherché n'empêche pas le réappariement des deux brins complémentaires malgré le mésappariement d'une paire de base. L'ADNc hybridé est alors purifié sur une colonne d'affinité contenant la protéine mutS immobilisée. Il est alors possible

40 de l'utiliser pour cribler une banque d'ADNc intestinale ou génomique totale.

40

Figure 4: Criblage d'inhibiteurs de l'activité déaminase d'apobec-1 à l'aide d'une technique de détection d'une déamination 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 d<sup>3</sup>HGTP 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 radiomarqué a lieu, et un signal est détecté.

#### EXEMPLES:

15 Exemple 1: Clonage du ou des gène(s) responsable(s) de la maladie d'Anderson par hybridation soustractive.

La première étape de l'exemple décrit sur la figure 2, consiste à isoler des cellules enterocytes provenant de l'intestin d'un patient et d'un individu normal. On procède ensuite à la synthèse de brins d'ADN complémentaires des ARNm extraits de ces cellules, à l'aide de l'enzyme Reverse Transcriptase. A la fin de la synthèse d'un second brin d'ADN complémentaire de cet ADN à l'aide de l'ADN polymérase, des bouts francs sont créés. Ceci permet la ligation d'une rallonge constituée d'une vingtaine de paires de base à chaque extrémité. On utilise deux séquences différentes pour le patient (rallonge-A) et pour l'individu normal (rallonge-N). L'ADNc ainsi récupéré est amplifié par PCR en utilisant comme amorces les séquences correspondant aux deux rallonges A et N, l'amorce correspondant au patient étant biotinilée par exemple. L'ADNc ainsi modifié des deux individus est alors mélangé et mis dans des conditions de dénaturation et réassociation. L'ADNc hybridé est mis en présence de billes magnétiques couvertes de streptavidine, ce qui permet finalement d'isoler en solution après plusieurs itérations, les ADNc de l'individu normal correspondant au gène non transcrit chez le patient. Une amplification par PCR de ce gène à l'aide des amorces correspondant à la rallonge N.

35 Exemple 2: Clonage du ou des gène(s) responsable de la maladie d'Anderson par utilisation de la protéine mutS.

La première étape de l'exemple décrit sur la figure 3, consiste à isoler des cellules enterocytes provenant de l'intestin d'un patient et d'un individu normal. On procède ensuite à la synthèse de brins d'ADN complémentaires des ARNm extraits de ces cellules en quantité équivalente

pour le patient et l'individu normal, à l'aide de l'enzyme Reverse Transcriptase. A la fin de la synthèse d'un second brin d'ADN complémentaire de cet ADN à l'aide de l'ADN polymérase, des bouts francs sont créés. Ceci permet la ligation d'une rallonge constituée d'une vingtaine de paires de base à chaque extrémité. L'ADNc ainsi modifié des deux individus est alors mélangé et mis dans des conditions de dénaturation et réassociation. Au moment de l'hybridation la mutation ponctuelle dans le gène recherché n'empêche pas le réappariement des deux brins complémentaires malgré le mésappariement d'une paire de base. L'ADNc hybridé est alors purifié sur une colonne d'affinité contenant la protéine mutS immobilisée. Il est alors possible de l'utiliser pour cribler une banque d'ADNc intestinale ou génomique totale.

Exemple 3: Criblage de molécules susceptibles d'inhiber l'activité déaminase d'apobec-1 à l'aide du système SPA®.

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, suivant la technique décrite dans la demande de brevet d'invention n° 97 04388. Brièvement, après l'incubation avec les inhibiteurs testés en présence de l'enzyme dans le milieu et avec les réactifs nécessaires, on 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 d<sup>3</sup>HGTP dans l'exemple illustré sur la figure 4). Dans le cas présent, il serait également possible d'utiliser d<sup>3</sup>HHTTP 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 d<sup>3</sup>HHTTP 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.

Maladie	Phénotype	Diagnostic	Déficiences
Maladie d'Anderson	Diarrhée chronique Mauvaise absorption des graisses, Manque de vigueur, Retard de croissance, Symptômes neurologiques modérés	Faible taux de cholestérol et d'apoB100, Taux de triglycéride normal, apoB48 et chylomicrons absents après un repas riche en graisse	?
Abétaipoprotéïnémie	Diarrhée chronique Mauvaise absorption des graisses, Manque de vigueur, Retard de croissance, Symptômes neurologiques très sévères	Faible taux de cholestérol, apoB100 et apoB48 absents, Chylomicrons, VLDL, LDL absents, Faible taux de triglycérides et cholestérol	MTP
Hypobétaipoprotéïnémie	indifférentiable du précédent	Les homozygotes ont un faible taux de cholestérol et de triglycérides, Les hétérozygotes ont approximativement 50 % du taux de cholestérol, triglycérides et apoB100	gène apoB tronqué

Tableau 1

## REVENDEICATIONS

5 1. Utilisation du gène de l'enzyme apobec-1, ou du gène de la protéine ABBP-1 ou de celui d'une protéine associée à l'enzyme apobec-1, ou encore d'un gène impliqué dans la maladie d'Anderson, pour la recherche et la fabrication de molécules ou agents thérapeutiques inhibant l'expression d'un ou plusieurs de ces gènes ou l'activité des enzymes ou protéines exprimées par ces gènes.

10 2. Utilisation des molécules ou agents thérapeutiques découverts et fabriqués selon la revendication 1 pour la fabrication de molécules ou agents thérapeutiques destinés à la prévention, la stabilisation ou le traitement de l'athérosclérose, l'obésité, du diabète de type II (non-insuline dépendant), ou autres maladies caractérisées notamment par une hypercholestérolémie, une hypertriglycémie et/ou par une hyperglycémie, due par exemple à  
15 un niveau de chylomicrons et/ou de VLDL dans le plasma supérieur à la normale.

3. Utilisation de molécules ou agents thérapeutiques suivant les revendications 1 à 2, caractérisée en ce que l'expression de plusieurs gènes est inhibée.

20 4. Utilisation de molécules ou agents thérapeutiques suivant les revendications 1 à 2, caractérisée en ce que l'activité de plusieurs protéines ou enzyme est inhibée.

5. Utilisation de molécules suivant les revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit de molécules anti-sens d'acide nucléique simple brin (ADN ou ARN) d'au moins 12  
25 nucléotides agissant sur le gène ou son ARN, ou sur une région régulatrice de l'expression du gène.

6. Molécule ou agent thérapeutique caractérisés en ce qu'ils sont utilisés selon les revendications 1 à 5.

30

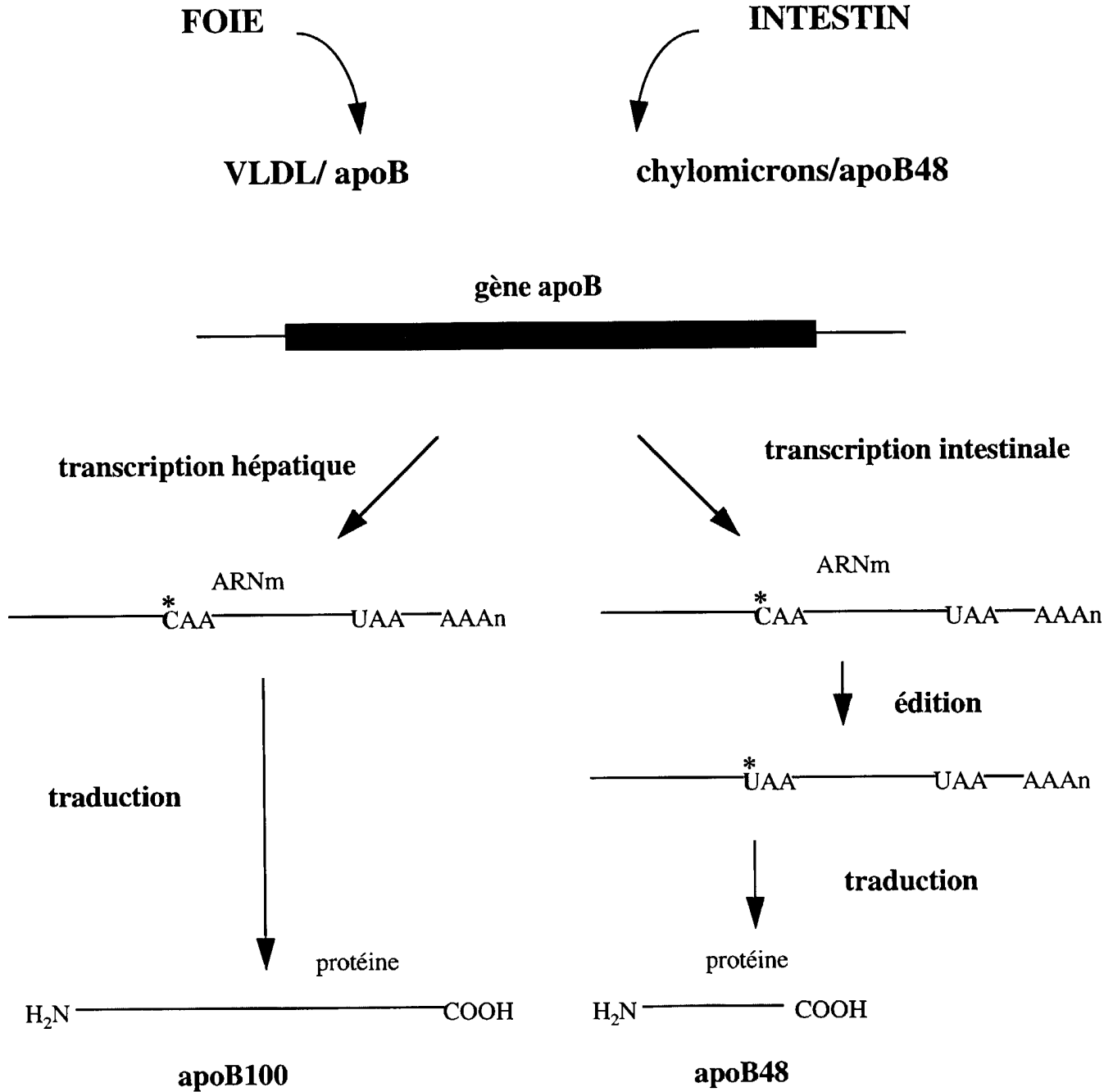
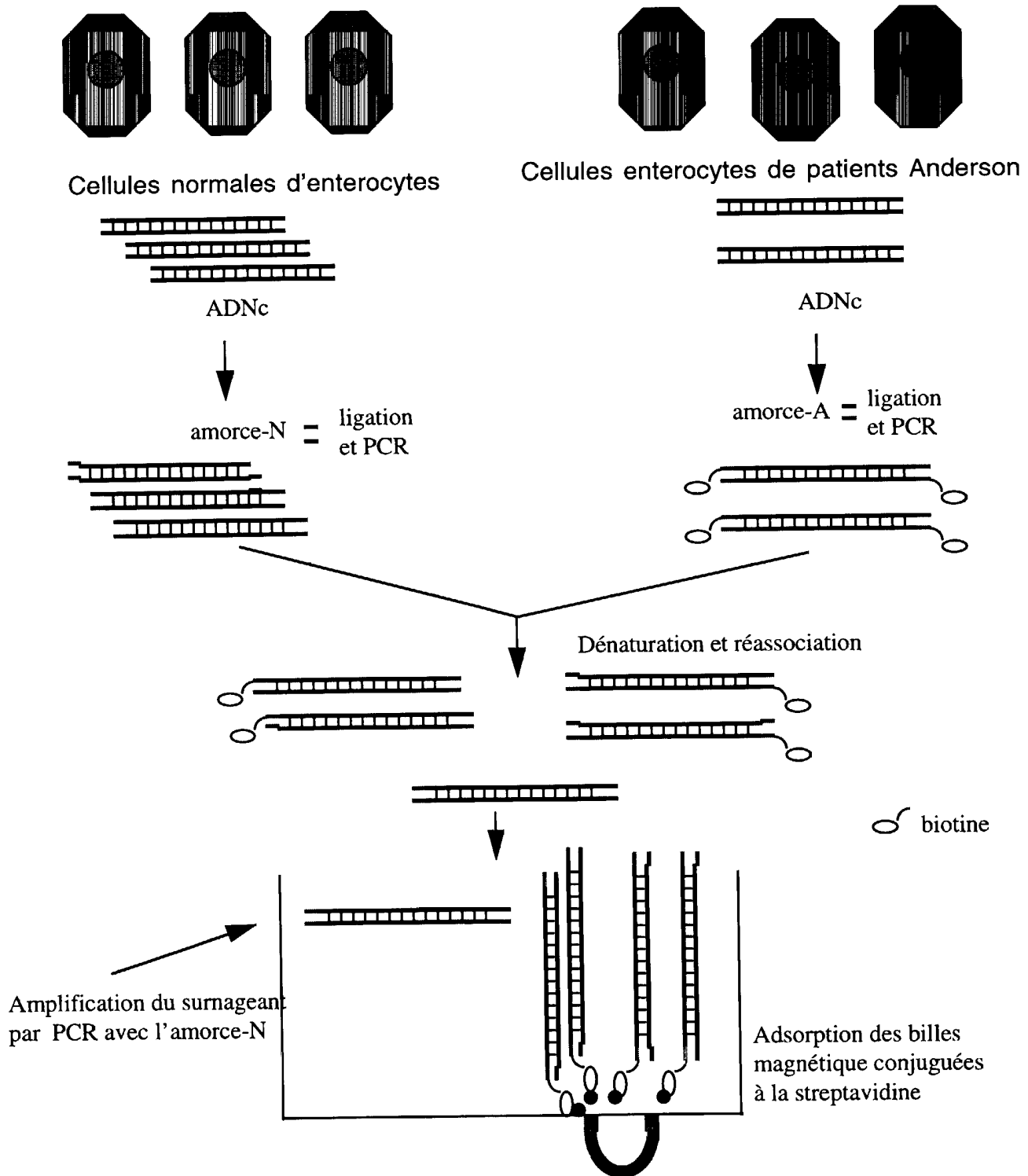


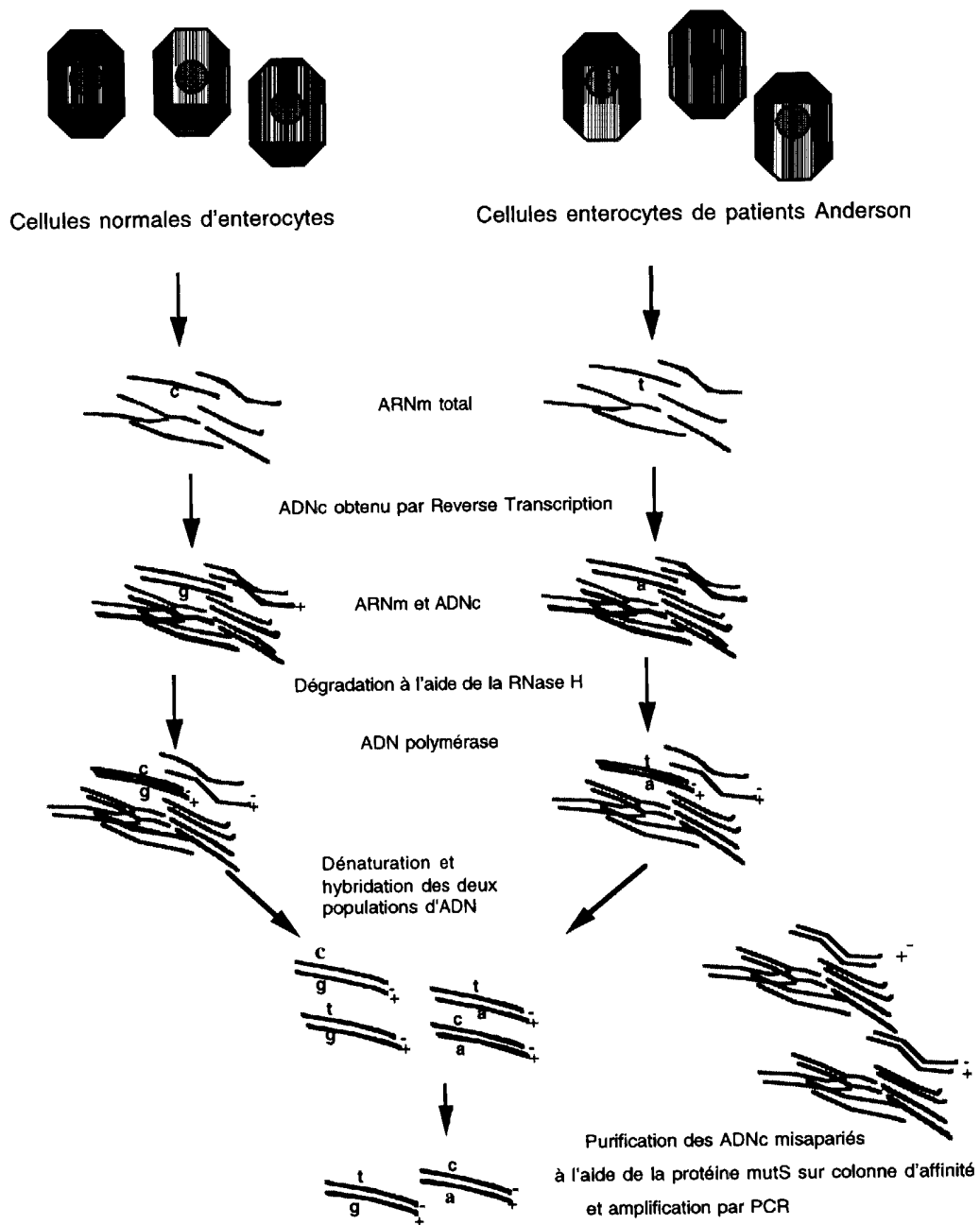
Figure 1/4

**STRATEGIE DE CLONAGE DU GENE DE LA MALADIE  
D'ANDERSON PAR HYBRIDATION SOUSTRACTIVE**



**Figure 2/4**

**STRATEGIE DE CLONAGE DU GENE DE LA MALADIE  
D'ANDERSON A L'AIDE DE LA PROTEINE mutS**



**Figure 3/4**

# Test de l'activité d'édition d'apobec-1

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

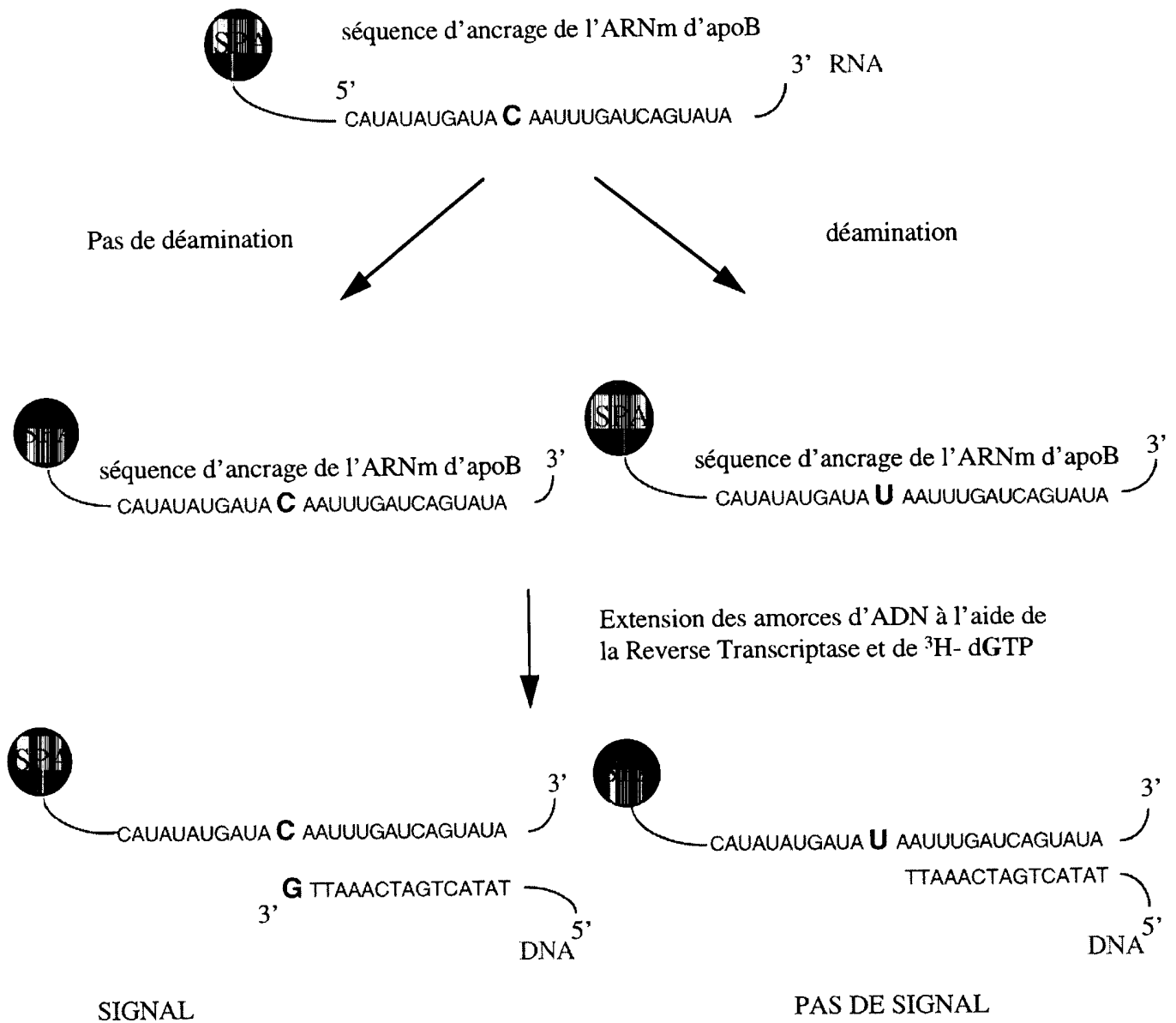


Figure 4/4

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement  
national

FA 553712  
FR 9716655

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	LAU P P ET AL: "Cloning of an Apobec -1-binding protein that also interacts with apolipoprotein B mRNA and evidence for its involvement in RNA editing." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 JAN 17) 272 (3) 1452-5., XP002076612	1,3-6
Y	* le document en entier *	2
D,Y	PHUNG, T. ET AL.: "Regulation of hepatic Apolipoprotein B RNA editing in the genetically obese Zucker rat." METABOLISM, vol. 45, septembre 1996, pages 1056-1058, XP002076613	2
X	OKA, K. : "Tissue-specific inhibition of apolipoprotein B mRNA editing in the liver by adenovirus-mediated transfer of a dominant negative mutant APOBEC-1 leads to increased low density lipoprotein in mice." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 272, 17 janvier 1997, pages 1456-1460, XP002076614	1,4,6
X	ANANT, S. ET AL.: "AU-rich RNA binding proteins HelN1 and AUF1 bind apolipoprotein B mRNA and inhibit posttranscriptional C to U editing" NUCLAIC ACIDS SYMPOSIUM SERIES, vol. 36, 1997, pages 115-118, XP002076615	1,4,6
		-/--
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 septembre 1998		Andres, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement  
national

FA 553712  
FR 9716655

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	GREEVE J ET AL: "RECONSTITUTION OF APOB MRNA EDITING TO LIVER BY GENE-TRANSFER AS A POTENTIAL APPROACH FOR THE TREATMENT OF SEVERE FORMS OF POLYGENIC HYPERCHOLESTEROLEMIA - AN OUTLINE OF THE RATIONALE " ZEITSCHRIFT FUER GASTROENTEROLOGIE, vol. 34, no. SUPPL. 03, juin 1996, pages 27-30, XP000652814 ---	
A	SMITH H C ET AL: "Base-modification mRNA editing through deamination - the good, the bad and the unregulated" TRENDS IN GENETICS, vol. 12, no. 10, octobre 1996, page 418-424 XP004037182 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 septembre 1998		Andres, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication  ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p>		
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  .....  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)