



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2009/01/30
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2009/08/06
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2010/07/22
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: IB 2009/050379
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2009/095887
(30) Priorité/Priority: 2008/01/30 (FR08/00492)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/11* (2006.01),
A61K 31/7088 (2006.01), *A61K 48/00* (2006.01),
C07H 21/02 (2006.01)

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

(72) Inventeurs/Inventors:
BEHR, JEAN-PAUL, FR;
KOTERA, MITSU HARU, FR;
PFENDER, NADEGE, FR;
REMY, JEAN-SERGE, FR

(74) Agent: BENOIT & COTE, S.E.N.C.

(54) Titre : siRNA CATIONIQUES, SYNTHÈSE ET UTILISATION POUR L'ARN INTERFÉRENCE

(54) Title: CATIONIC siRNAs, SYNTHESIS AND USE FOR INTERFERING RNA

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention se rapporte à des siRNA cationiques, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments d'ARN double brin, aux extrémités desquels sont greffés des oligocations, le nombre de charges cationiques greffées étant comparable ou supérieur à celui des charges anioniques portées par les phosphates internucléosidiques des brins d'ARN.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
6 août 2009 (06.08.2009)(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/095887 A1(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2009/050379(22) Date de dépôt international :
30 janvier 2009 (30.01.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08/00492 30 janvier 2008 (30.01.2008) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, Rue Michel-Ange, 75794 Paris
cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BEHR, Jean-Paul** [FR/FR]; 7, Rue Eugénie, 67100 Strasbourg (FR). **KOTERA, Mitsuharu** [JP/FR]; 10, rue du Dôme, 67000 Strasbourg (FR). **PFENDER, Nadège** [FR/FR]; 10, rue Lamartine, 67640 Lispheim (FR). **REMY, Jean-Serge** [FR/FR]; 56, rue Principale, 67370 Neugartheim (FR).(74) Mandataire : **PEAUCELLE, Chantal**; Cabinet Armen-
gaud Aîné 3, Avenue Bugeaud, 75116 Paris (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

(54) Title: CATIONIC SIRNAS, SYNTHESIS AND USE FOR INTERFERING RNA

(54) Titre : siRNA CATIONIQUES, SYNTHÈSE ET UTILISATION POUR L'ARN INTERFÉRENCE

(57) Abstract: The invention relates to cationic siRNAs, characterized in that they are double-stranded RNA fragments, grafted to the ends of which are oligocations, the number of cationic charges grafted being comparable to or greater than that of the anionic charges carried by the internucleoside phosphates of the RNA strands.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à des siRNA cationiques, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments d'ARN double brin, aux extrémités desquels sont greffés des oligocations, le nombre de charges cationiques greffées étant comparable ou supérieur à celui des charges anioniques portées par les phosphates internucléosidiques des brins d'ARN.



WO 2009/095887 A1

siRNA cationiques, synthèse et utilisation pour l'ARN interférence

L'invention se rapporte à des siRNA (pour small interfering ribonucleic acid) cationiques, à leur synthèse automatisée ainsi qu'à leurs applications biologiques basées sur leurs propriétés de pénétration intracellulaire et mettant en jeu le mécanisme d'ARN interférence.

L'ARN interférence est un mécanisme intracellulaire permettant le contrôle séquence-spécifique de l'expression d'un gène endogène ou exogène. Les médiateurs de ce mécanisme sont de petites hélices d'acide ribonucléique bicaténaire d'environ 2 tours, les siRNA, de séquence identique à un fragment du gène-cible. Bien que l'ARN interférence puisse aboutir à la modification permanente du gène-cible dans la chromatine d'une cellule, l'effet le plus immédiat de l'introduction d'un siRNA dans une cellule est l'inactivation de l'ARN messenger-cible. Les siRNA sont généralement constitués de deux oligoribonucléotides 19-mères de séquences complémentaires comportant des extensions 3'-dTdT, mais certains appariements imparfaits ou des séquences jusqu'à 27-mères peuvent également être efficaces.

La disparition d'une protéine ou la destruction sélective d'un ARN viral peuvent avoir des applications thérapeutiques d'intérêt majeur dans des domaines aussi variés que la cancérologie, l'allergie ou les maladies infectieuses. Malheureusement, les cellules animales intactes sont imperméables aux acides nucléiques, comme le montrent les tentatives infructueuses d'introduction de siRNA tels quels dans des cellules en culture ou in vivo. L'expérimentation animale montre néanmoins que le foie, un organe capable de régénérer rapidement ses cellules, ou bien les cellules musculaires, qui sont particulièrement grandes et robustes, peuvent capter des siRNA et survivre à la rupture de leur membrane cellulaire induite par le processus d'injection. Mais l'injection intraveineuse rapide d'un grand volume de liquide ou le caractère très localisé de l'injection intramusculaire ne sont pas compatibles avec l'utilisation en thérapie humaine.

La transfection de siRNA dans le cytoplasme de cellules -sans rupture de la membrane cellulaire- peut être obtenue après mélange avec un excès de

transporteur cationique. Des macromolécules polycationiques comme la polyéthylènimine ou des agrégats de lipides cationiques sont capables de jouer ce rôle de vecteur (1). Les molécules de siRNA polyanioniques s'aggrègent en effet avec un excès de transporteur en formant un fin précipité cationique. Ces particules permettent la transfection efficace de siRNA dans un grand nombre de cellules en culture par l'intermédiaire d'héparanesulfates anioniques présents à la surface des cellules (2).

Dans un animal, il n'en va plus de même. Injectées dans le sang, les particules sont captées et digérées par les cellules qui phagocytent les particules microbiennes. Injectées dans un tissu ou une tumeur, leur taille (100-1000nm) empêche leur diffusion vers les cellules situées au-delà du site d'injection. Des travaux récents de (3) et (4) montrent néanmoins qu'il est possible d'éviter les cellules phagocytaires du sang sans inhiber totalement la fixation cellulaire, en recouvrant les particules par des résidus de polyéthylèneglycol (particules furtives).

Ces considérations ont conduit les inventeurs à envisager la synthèse de siRNA intrinsèquement cationiques, c'est-à-dire de molécules de siRNA modifiées où les charges cationiques compenseraient les charges anioniques portées par les phosphates de l'acide nucléique. Ces composés pourraient éventuellement se passer d'un vecteur pour pénétrer dans la cellule et par conséquent le médicament aurait l'avantage d'être moléculaire au lieu d'être particulaire.

Afin de ne perturber ni la fixation du siRNA au complexe protéique qui détruit l'ARN messager, ni la reconnaissance de ce dernier par hybridation, les modifications chimiques ne sont possibles qu'aux extrémités de l'acide nucléique.

De très nombreux motifs chimiques ont été greffés par le passé aux extrémités d'oligonucléotides, dans le but d'augmenter leur pénétration cellulaire à des fins de thérapie par les approches antisens. Quelques articles publiés très récemment font état de tentatives similaires dans le domaine des siRNA.

Un premier article paru en 2006 fait état de la conjugaison de polyéthylèneglycol à un siRNA à travers un pont disulfure, mais l'internalisation cellulaire nécessite tout de même l'association non-covalente par mélange avec un polymère cationique (5).

En 2007, 2 articles décrivent l'utilisation de siRNA (40 charges anioniques) conjugués à divers peptides cationiques comportant 7 ou 8 charges cationiques. Ces siRNA restent très anioniques et de l'aveu des auteurs eux-mêmes, la pénétration intracellulaire et l'efficacité ne sont pas augmentées (6) et (7).

Le greffage chimique direct d'un polycation préformé à un oligonucléotide comme décrit dans les articles précédents est possible, mais cause des problèmes de précipitation et peut rendre la caractérisation imprécise à cause de la polydispersité du polymère cationique dès que l'on manipule des polycations comportant un nombre de charges comparable à celui de l'oligonucléotide. Les inventeurs ont surmonté les problèmes ci-dessus en s'appuyant sur une technique de synthèse séquentielle de l'oligocation par une chimie de conjugaison identique à celle utilisée pour la synthèse de la séquence oligoribonucléotidique elle-même. La synthèse automatique de conjugués oligodeoxyribonucléotides-oligospermines a fait l'objet d'une précédente demande internationale PCT (8).

Des modifications importantes ont été apportées à la synthèse/purification/caractérisation/conservation des composés décrits dans la précédente demande PCT, la présence du groupement 2'-OH rendant la synthèse plus difficile et surtout rendant les composés plus instables : sa déprotection implique une étape supplémentaire – des traces de RNases dégradent l'ARN – les fonctions ammonium/amine des spermines sont des catalyseurs acidobasiques provoquant l'hydrolyse des conjugués oligoribonucléotide-oligospermine.

L'invention vise donc à fournir des siRNA intrinsèquement cationiques.

Elle vise également une méthode de synthèse de ces siRNA cationiques qui puisse être étendue à l'échelle industrielle en vue de la production GMP.

Selon un autre aspect, l'invention vise aussi les applications des nouveaux siRNA dans les domaines pharmaceutiques et biotechnologiques.

Les siRNA cationiques de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments d'ARN double brin, aux extrémités desquels sont greffés des oligocations, le nombre total de charges cationiques greffées étant comparable ou supérieur à celui des charges anioniques portées par les phosphates internucléosidiques des brins d'ARN.

De manière inattendue, et comme démontré par les résultats donnés dans les exemples, de tels siRNA cationiques, sont capables d'induire un phénomène d'ARN interférence en l'absence de tout agent de transfection. La démonstration est réalisée dans un environnement contrôlé, sur des cellules en culture, où des conjugués siRNA-oligopeptides cationiques restant globalement anioniques n'ont pas montré d'effet (vide supra).

Par « ARN double brin », on entend une double hélice d'acide nucléique de la famille A induite par la présence d'un atome autre que H en position 2' du ribose (par opposition à l'ADN qui est une hélice B).

La charge globale Σ du siRNA cationique, c'est-à-dire la somme totale des charges cationiques greffées chimiquement diminuée de la somme totale des charges anioniques des groupements phosphates internucléosidiques, est de -30 à +50. En effet, des siRNA (charge -40) greffés à un peptide TAT de séquence SEQ ID N°1 GRKKRRQRRRPPQC (charge +9 ; Σ = -31) ou à un peptide pénétratine de séquence SEQ ID N°2 RQIKIWFQNRRMKWKKC (charge +8 ; Σ = -32) ne sont pas capables d'induire le phénomène d'ARN interférence sans vecteur (9).

La complémentarité des bases de la double hélice d'ARN peut être parfaite ou partielle.

Dans une variante de réalisation, chaque oligoribonucléotide présente une extension simple brin en 3' de la double hélice.

Dans une autre variante, les oligocations sont greffés en 3' ou/et 5' du brin sens ou/et en 3' du brin antisens, le brin antisens étant celui qui guide le complexe

protéique responsable de la dégradation de l'ARN messager. Le greffage en position 5' du brin antisens abolit l'effet d'ARN interférence.

De manière préférée, les siRNA cationiques objet de l'invention sont constitués de fragments d'ARN double brin longs de 15 à 30 ribonucléotides, en particulier 19 à 30 ribonucléotides, aux extrémités desquels sont greffés, par liaison covalente, 1 à 3 oligocations dont le nombre de charges cationiques cumulées est comparable ou supérieur au nombre de charges anioniques portées par l'ARN.

L'invention vise plus particulièrement des siRNA cationiques dans lesquels un brin au moins répond à la formule (I)

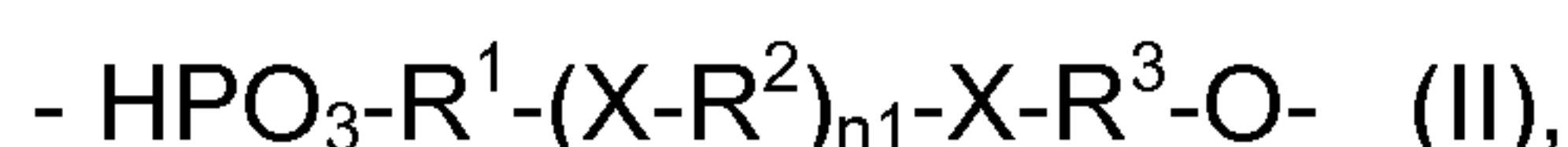


dans laquelle

.Ni représente un oligoribonucléotide i-mère, avec $i = 15$ à 30 , en particulier 19 à 30 , ainsi que toutes modifications chimiques ou substitutions conservant la forme A de la double hélice du siRNA,

.Aj représente un oligocation j-mère, avec $j = 1-50$, A répondant

- à la formule (II)



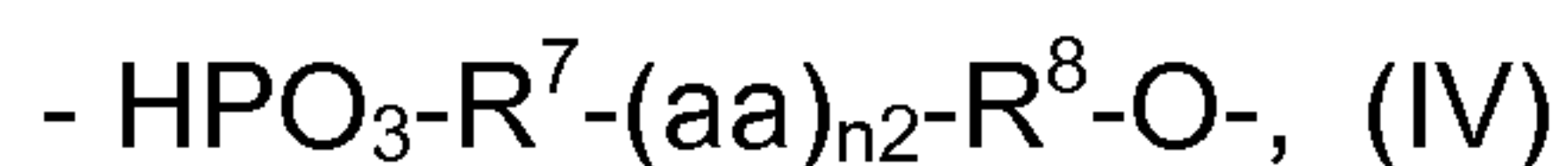
avec R^1 , R^2 et R^3 , identiques ou différents, représentant un radical alkylène inférieur, X étant NH ou $\text{NC(NH}_2\text{)}_2$, $n1 = 2$ à 20 , ou

- à la formule (III)



avec R^4 , R^5 et R^6 , identiques ou différents, représentant un radical alkylène inférieur et X^1 étant choisi parmi la putrescine, la spermidine ou la spermine, ou

- à la formule (IV)

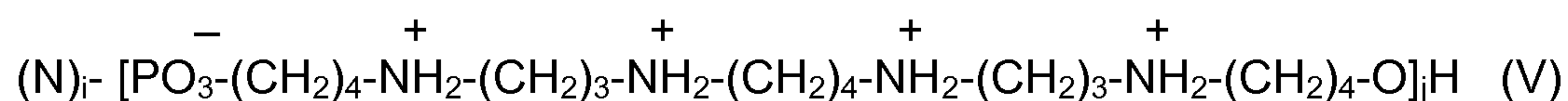


avec R^7 et R^8 identiques ou différents, représentant un radical alkylène inférieur, $(\text{aa})_{n2}$ étant un peptide contenant des acides aminés naturels avec des chaînes latérales cationiques comme l'arginine, la lysine, l'ornithine, l'histidine, l'acide diaminopropionique et $n2 = 2$ à 20.

Par « radical alkylène inférieur », on entend, dans la description et les revendications, un radical alkylène en C1-C5, linéaire, branché ou substitué.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, les oligocations sont des oligoamines. Ces oligoamines sont avantageusement choisies dans le groupe comprenant la spermine, la spermidine ou la putrescine.

Des siRNA cationiques correspondants sont avantageusement des oligonucléotides-oligospermines de structure (V)



dans laquelle N, i et j sont tels que définis ci-dessus.

Les domaines d'application de l'ARN interférence sont grandissants. Les siRNA sont utilisés par l'industrie pharmaceutique et biotechnologique pour établir un lien entre gènes, maladies et molécules potentiellement actives contre ces maladies; ce sont essentiellement des techniques de criblages haut débit sur des cellules animales. Les siRNA cationiques de l'invention permettent de simplifier le criblage, et surtout d'étendre la technique à des animaux où physiologie, biodistribution, excrétion, seraient prises en compte dans la validation d'un composé en phase préclinique, augmentant ainsi les chances de succès et réduisant les coûteux échecs en phase clinique.

Le plus grand potentiel des siRNA se trouve néanmoins dans leur utilisation directe en tant que médicaments pour inhiber la biosynthèse d'un ARN ou d'une protéine

dans les cellules d'un patient. Des pathologies très diverses comme le cancer, les infections virales, l'asthme ou encore les maladies auto-immunes deviennent alors curables.

L'invention couvre par conséquent l'utilisation de siRNA cationiques pour ces applications.

L'invention vise ainsi les siRNA cationiques définis ci-dessus pour une utilisation comme médicaments.

Plus particulièrement, l'invention vise des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un siRNA tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte.

Elle vise également l'application desdits siRNA cationiques en biologie moléculaire, génomique fonctionnelle ainsi que dans les techniques de criblage.

L'invention vise également un procédé de synthèse automatisée d'un brin de siRNA cationique, caractérisé en ce qu'il comprend :

le couplage séquentiel 3' vers 5' de ribonucléotides sur support solide, précédé et/ou suivi du couplage séquentiel de synthons cationiques, le brin répondant à la formule (VI)



avec N, i, A, et j tels que définis ci-dessus

L'invention vise plus particulièrement un procédé de synthèse de siRNA cationiques dans lesquels les synthons cationiques sont des oligoamines phosphoramidites et répondent

- à la formule (VII)



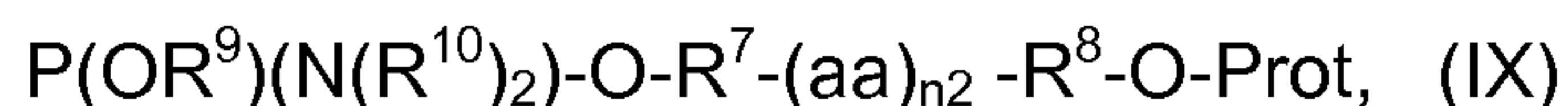
dans laquelle R^1 , R^2 , R^3 , et $n1$ sont tels que définis ci-dessus, X est un groupe NH ou $\text{NC}(\text{NH}_2)_2$ protégé, R^9 est $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, ou un radical alkylène inférieur, R^{10} est un radical alkylène inférieur, ou $-\text{N}(\text{R}^{10})_2$ est un radical pyrrolidino, pipéridino ou morpholino et Prot est un groupe protecteur utilisé en synthèse oligonucléotique, tel que DMT, MMT; ou

- à la formule (VIII)



dans laquelle R^4 , R^5 , R^6 identiques ou différents, représentent radical alkylène inférieur, X^1 est une putrescine, spermidine ou spermine avec des groupements protecteurs appropriés, R^9 et R^{10} sont tels que définis ci-dessus; ou

à la formule (IX)



dans laquelle R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , $n2$, et Prot sont comme défini ci-dessus, $(\text{aa})_{n2}$ est un peptide contenant des acides aminés naturels avec des chaînes latérales cationiques protégés, comme l'arginine, la lysine, l'ornithine, l'histidine, l'acide diaminopropionique et $n2= 2$ to 20.

Dans un mode préféré de l'invention l'oligoamine est une oligospermine

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent.

Les caractéristiques de synthèse et de purification de conjugués oligoribonucléotide-oligospermine ainsi que les propriétés d'ARN interférence des siRNA correspondants sont détaillées dans ces exemples, sans limiter l'invention à ces seuls composés. En particulier, la synthèse d'un 21-mère ciblant la luciférase et comportant jusqu'à 30 motifs spermine est décrite. Lorsque le nombre de charges cationiques avoisine le nombre de phosphates portés par le siRNA correspondant, on observe une extinction particulièrement importante et sélective du gène de la luciférase dans une lignée cellulaire qui exprime constitutivement ce gène.

Dans les exemples, il sera fait référence aux Figures 1 à 6, qui représentent respectivement :

Figure 1 : Analyse HPLC montrant la dégradation de l'oligonucléotide <GL3ss>S₅ dans l'eau.

Figure 2 : Profil HPLC des oligonucléotides <GL3ss>S_n, avec n = 0, 1, 3, 5, et <GL3as>S_n, avec n = 0, 1.

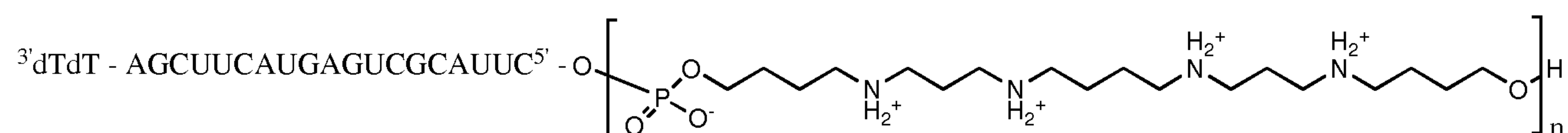
Figure 3 : Spectres de masses MALDI-TOF.

Figure 4 : Extinction du gène de la luciférase en fonction du nombre de spermines.

Figure 5 : Extinction du gène de la luciférase en fonction de la concentration du siRNA.

Figure 6 : Contrôles de spécificité.

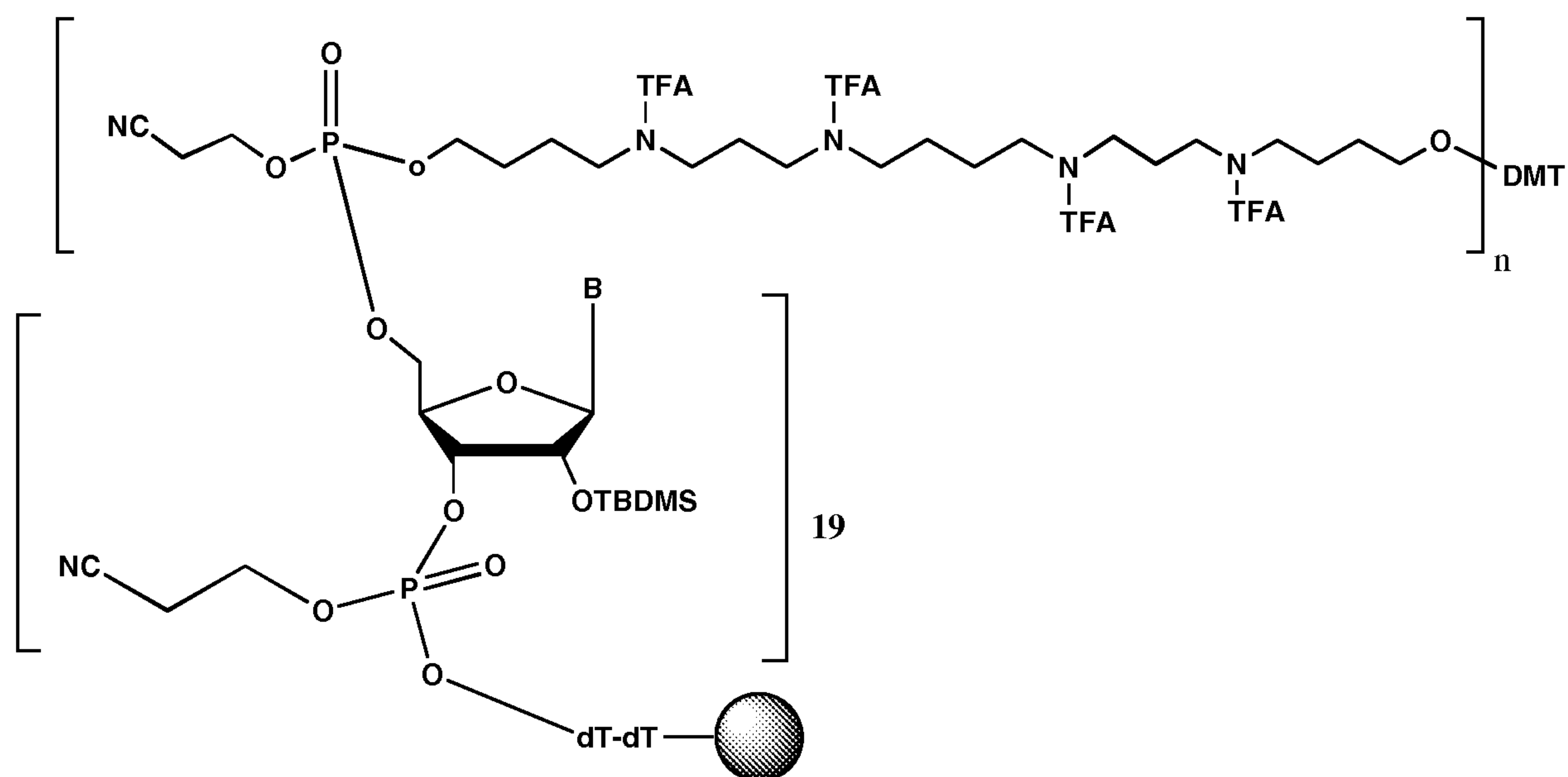
Exemple 1 : Synthèse, purification et caractérisation d'oligonucléotides 21-mère comportant n spermines, de formule :



<GL3ss>S_n, où <GL3ss> est un oligonucléotide 21-mère, S est un résidu phosphospermine, n = 0, 1, 3, 5, 20, 30

Synthèse automatisée : une série d'oligonucléotides 21 mères <GL3ss> protégés, de séquence SEQ ID N°3 ^{3'}dTdT- A G C U U C A U G A G U C G C A U U C^{5'} dont la partie ribonucléotidique, correspondant aux nucléotides 153 à 171 du gène de la luciférase *Photinus pyralis* présent dans le plasmide GL3 (Proméga), a été synthétisée en phase solide en utilisant la chimie des phosphoramidites β-cyanoéthyles (CE), sur un synthétiseur Expedite. La résine comportait déjà 2 deoxythymidines préalablement greffées. La synthèse a été poursuivie avec n cycles

utilisant le synthon spermine phosphoramidite. Les composés de structure ci-dessous ($n = 0, 1, 3, 5, 20, 30$), fixés sur la résine, ont été obtenus.



Les phosphoramidites CE, les supports Ultramild et les réactifs généraux utilisés pour la synthèse automatisée proviennent de Glen Research (Eurogentec). La phosphoramidite spermine provient de Novalyst. Les réactifs Ultramild permettent la déprotection des groupements protecteurs des bases nucléiques et le clivage simultané de l'oligo du support solide dans des conditions alcalines plus douces. Les monomères utilisés, à savoir A protégé par le groupement phénoxyacétyle (Pac-A-CE), G protégé par le groupement 4-isopropyl-phénoxyacétyle ((iPr-Pac)-G-CE) et C protégé par un groupement acétyle (Ac-C-CE) ont permis d'éviter la dégradation des composés au cours du work-up. La position 2'-OH des nucléotides a été protégée par le groupement protecteur tertibutyldiméthylsilyle TBDMS.

La synthèse automatisée a été réalisée dans les conditions de couplage standard, excepté dans le cas du couplage de la phosphoramidite spermine qui a nécessité un temps de réaction plus long (20 minutes) et une solution en phosphoramidite plus concentrée (0,1M soit 120 mg par ml d'acétonitrile anhydre). Dans le cas du couplage de 20 et 30 spermines, une double réaction de couplage a été nécessaire dans le cas des 4 premières spermines.

Les fractions contenant le cation coloré diméthoxytrityle libéré à chaque étape de la synthèse ont été collectées, diluées et analysées par spectrophotométrie afin de déterminer les rendements des étapes de couplage. Pour les couplages des quatre nucléotides naturels (A, U, C et G), les rendements excédaient 97%, tandis que les rendements de couplage de la phosphoramidite spermine se trouvaient entre 90 et 98%.

De manière analogue, ont été synthétisées

- une séquence-contrôle négatif comportant 20 spermines SEQ ID N°4, dont la séquence est issue de la région correspondante de la luciférase du plasmide GL2 (Proméga) $3'$ dTdT- A G C U U C A U A A G G C G C A U G C $5'$. L'oligonucléotide <GL2ss>S₂₀ comporte 3 mismatches par rapport à la séquence homologue de GL3 et de ce fait le siRNA correspondant n'a pas la capacité d'interférer avec l'ARN messenger de la luciférase GL3 produit par les cellules.
- une séquence antisens SEQ ID N°5 $3'$ dTdT-G A A U G C G A C U C A U G A A G C U $5'$ comportant une spermine en 5'. Ici, c'est l'autre brin <GL3as>S₁ de la double hélice de siRNA qui porte la partie cationique.

	Rendement de couplage moyen des spermines
<GL3ss>S ₁	98%
<GL3ss>S ₃	97%
<GL3ss>S ₅	95%
<GL3ss>S ₂₀	92%
<GL3ss>S ₃₀	90%
<GL3as> S ₁	98%
<GL2ss>S ₂₀	90%

Dans tous les cas, la stratégie DMT-ON a été utilisée, conservant le groupement DMT en position 5' finale des oligomères afin de faciliter la purification.

Traitement post-synthétique : Après la synthèse automatisée, les oligomères ont été libérés du support solide et déprotégés simultanément dans les conditions Ultramild

standard, par traitement à l'ammoniaque 28% à température ambiante, pendant une nuit.

Après lyophilisation, la seconde étape a consisté en la déprotection du groupement TBDMS en position 2'-OH, à l'aide d'une solution 1.0 M de fluorure de tetrabutylammonium TBAF dans le THF (Aldrich). Les oligonucléotides ont été traités par 50 équivalents de TBAF par groupement TBDMS pendant 15h, à température ambiante, dans l'obscurité.

Purification : Les oligonucléotides ont été purifiés en utilisant des colonnes Poly-Pak II™ (Glen Research/Eurogentec) d'après les instructions données par le fournisseur. L'élution finale était réalisée à l'aide d'un mélange acétonitrile/eau (50/50) dans tous les cas, excepté pour les oligonucléotides comportant 20 et 30 spermines qui ont nécessité l'utilisation d'acétonitrile/ammoniaque aqueux 28% dilué au 1/20e (20/80). Les fractions contenant l'oligonucléotide ont été révélées en posant une goutte sur une plaque de silice couche mince fluorescente et ont été immédiatement réunies et lyophilisées afin d'éliminer les solvants et éviter la dégradation. Une poudre blanche a ainsi été obtenue.

La manipulation d'oligoribonucléotides a de plus nécessité l'exclusion minutieuse des sources de ribonucléases. Il a donc été essentiel de porter des gants afin d'éviter la contamination par les RNAses présentes sur les mains. Du matériel stérile (pipettes, tubes Eppendorf) a été utilisé, le tout sous une hotte à flux laminaire.

Au départ, les échantillons d'ARN ont été solubilisés dans l'eau et conservés au congélateur. Si les brins non modifiés sont restés stables, et ce même après plusieurs mois dans ces conditions, l'analyse HPLC a montré que les oligoribonucléotides-oligospermines se sont dégradés très rapidement (Figure 1, c.f. conditions HPLC ci-dessous).

Les oligonucléotides ont donc été solubilisés dans un tampon phosphate pH 5,6 (50mM) et conservés à -20°C ce qui a permis d'éviter la dégradation des composés par hydrolyse catalysée par les spermines, et ce même après 3 mois (suivi HPLC).

La concentration des oligonucléotides a été déterminée en utilisant le coefficient molaire d'extinction suivant (260nm, mol⁻¹ dm³ cm⁻¹) :

$$\varepsilon = (15,4 N_A + 11,7 N_G + 7,4 N_C + 8,8 N_U) \times 0,9 \times 10^3$$

Les oligonucléotides de charge globalement négative comportant respectivement 0, 1, 3, et 5 spermines ont été analysés par HPLC échangeuse d'anions (Macherey Nagel SAX 1000-8) avec un gradient linéaire de B allant de 0 à 100% en 15 minutes (A : KH₂PO₄ 20mM, AcCN 20% ; B : A, NaCl 1M). Les profils HPLC sont montrés en Figure 2.

Les oligonucléotides ont été solubilisés dans 500µl d'eau distillée. L'échantillon et la matrice d'acide betahydroxypyruvique ont été mélangés ensemble sur la plaque. Une fois cristallisé, l'échantillon a été analysé sur un appareil BRUKER Ultraflex. Les spectres de masses sont donnés en Figure 3.

	Masse attendue (g/mole)	Masse observée
<GL3ss>	6606,9	6612,2
<GL3ss>S ₁	7015,5	7031,2
<GL3ss>S ₃	7832,5	7857,9
<GL3 as>	6693,9	6740,2
<GL3 as> S ₁	7101,6	7119,5
<GL2 ss>	6669,0	6678,2

Exemple 2 : ARN interférence ; extinction du gène de la luciférase par les siRNA cationiques. Effet du nombre de charges cationiques.

Culture cellulaire : La lignée cellulaire A549Luc provient de cellules épithéliales bronchiques humaines (CCL-185, ATCC) par transfection stable du plasmide pGL3 (Proméga).

Les cellules A549Luc ont été mises en culture dans du milieu RPMI 1640 complet (Eurobio) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (FCS, Perbio), 2 mM de glutamax (Eurobio), 100 U/ml de pénicilline (Eurobio) et de 100µg/ml de streptomycine (Eurobio) et incubées à 37°C, 5% de CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité.

Un jour avant la transfection des siRNA, les cellules ont été décollées par de la trypsine (Eurobio) et resuspendues dans du milieu RPMI/FCS auquel 16µl/ml d'antibiotique G-418 (Proméga) ont été additionnés. Des plaques de 24 puits ont été préparées avec 25000 cellules par puits dans 1ml de milieu complet.

Formation des duplex siRNA et incubation avec les cellules : Dans un premier temps les duplex siRNA ont été préparés par mélange équimolaire de leur deux brins complémentaires, hybridation par chauffage à 70°C et refroidissement. Les concentrations étaient ajustées à des concentrations finales sur les cellules de 1, 10, ou 100 nM. Les duplex formés ont ensuite été dilués dans 100 µl du milieu RPMI.

Le contrôle positif de pénétration des siRNA dans les cellules a été effectué à l'aide de l'agent de transfection lipidique INTERFERin (Polyplus-transfection) utilisé selon les recommandations du fabricant. INTERFERin (2 µl) a été additionné au siRNA. Le mélange a été immédiatement homogénéisé et laissé au repos 10 minutes à température ambiante afin de favoriser la formation des complexes.

Pendant ce temps, le milieu de culture des cellules a été aspiré et les cellules adhérentes ont été lavées au tampon phosphate (PBS). Puis 500µl de RPMI ont été additionnés à chaque puits.

Les duplex siRNA (ou siRNA/INTERFERin) ont été ajoutés aux cellules (100µl/puits). La plaque a été homogénéisée par rotation manuelle. Chaque condition a été réalisée en triplica.

La plaque a été incubée à 37°C, 5% CO₂ durant 4h. Au bout de ce laps de temps, les cellules ont été observées au microscope pour vérifier l'absence de toxicité et 500µl de milieu RMPI additionné de 20% de FCS ont été ajoutés dans chaque puits.

La plaque a été incubée à l'étuve, à 37°C et 5%CO₂ durant 48h.

Mesure de l'expression du gène de la luciférase : Après 48h, les cellules ont été lavées au PBS puis lysées à l'aide d'une solution commerciale stock diluée 5x (Proméga). La plaque a ensuite été incubée 30 minutes à température ambiante. Les solutions ont été récupérées dans des microtubes et centrifugées 5 min à 1400 rpm à 4°C.

10µl de chaque échantillon ont été déposés sur une plaque de 96 puits. La plaque a été analysée à l'aide d'un luminomètre (Mediators PhL ou Berthold Centro LB690). Pour chaque échantillon, la lumière émise par la réaction catalysée par la protéine luciférase a été mesurée et normalisée sur une durée de 10 s.

Dosage des protéines cellulaires totales : Une gamme BSA (sérum albumine bovine) a préalablement été préparée afin de servir d'étalonnage. 15 µl de tampon de lyse ont été ajoutés par tube. 15µl de chaque échantillon à analyser ont été introduits dans des tubes. 3 blancs constitués de 15µl de tampon de lyse chacun ont été réalisés. 1ml de solution BCA (bicinchoninic acid) mix a été additionné dans chaque tube. Les mélanges obtenus ont ensuite été placés au bain marie à 60°C durant 30 minutes. L'absorbance a été lue à 562 nm.

Evaluation de l'extinction du gène de la luciférase : Les résultats ont d'abord été exprimés en RLU (Relative Light Unit) intégrés sur 10 secondes, normalisés par milligramme de protéines du lysat cellulaire. L'efficacité d'extinction de gène pour chaque condition a ensuite été exprimée en pourcentage de l'expression de la luciférase dans des cellules non incubées en présence de siRNA. Chaque barre représente la valeur moyenne du pourcentage d'expression du gène luciférase ainsi que sa déviation standard.

De haut en bas, la Figure 4 montre successivement que

- le siRNA <GL3ss><GL3as> formé des brins sens (ss) et antisens (as) de la séquence de la luciférase GL3 n'est pas actif ;
- ce même siRNA éteint l'expression de la luciférase lorsqu'il est vectorisé par le lipide cationique INTERFERin ;

- l'introduction de 1-3 spermines dans la molécule n'a que peu d'effet sur l'expression de la luciférase ;
- l'introduction de 20-30 spermines dans le siRNA conduit à une extinction comparable à celle obtenue en utilisant le vecteur INTERFERin.
- l'efficacité du siRNA avec 30 spermines augmente encore d'environ 10 fois en association avec un véhicule lipidique.

Il est tout à fait remarquable que ces effets sont observés à une concentration nanomolaire, c'est-à-dire 10.000 fois inférieure à celle utilisée dans les expériences effectuées avec les peptides TAT et pénétratine (9).

Exemple 3 : ARN interférence ; extinction du gène de la luciférase par les siRNA cationiques. Effet de la concentration.

La Figure 5 montre de haut en bas

- les contrôles du siRNA sans spermine vectorisé par INTERFERin montrant un effet à 1 nM ;
- l'expression de la luciférase GL3 n'est pas diminuée lorsque les cellules sont incubées avec le siRNA sans spermine greffée et sans INTERFERin, quelle que soit la concentration ;
- une diminution concentration-dépendante de la luciférase en présence des siRNA comportant 20 et 30 spermines.

Exemple 4 : ARN interférence ; extinction du gène de la luciférase par les siRNA cationiques. Expériences de validation.

La Figure 6 valide les revendications et la spécificité de l'ARN interférence.

Après les contrôles négatif (100% d'expression des cellules seules) et positif (27% d'expression de la luciférase GL3 en présence du siRNA de séquence GL3 vectorisé par INTERFERin), le siRNA <GL3ss><GL3as>S₁ comportant cette fois une spermine greffée en position 5' du brin *antisens* a été testé.

Les barres 3 à 6 montrent que le greffage de la spermine en position 5' du brin antisens fait disparaître l'effet d'extinction de la luciférase. Il est en effet connu que

cette position du siRNA doit être préalablement phosphorylée par la cellule pour pouvoir observer le phénomène d'ARN interférence.

Les barres 7 et 8 montrent que, même à une concentration 10 fois supérieure, le siRNA GL2 avec 20 spermines, comportant 3 mismatch par rapport à la cible GL3, ne diminue pas l'expression de la luciférase GL3.

Références Bibliographiques

- 1 - BOLCATO-BELLEMIN, A.L., BONNET, M.E., CREUSAT, G., ERBACHER, P., and BEHR, J.P. (2007). Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16050-16055
- 2 - KOPATZ, I., REMY, J.S., and BEHR, J.P. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* 6, 769-776
- 3 - ZIMMERMANN, T.S., LEE, A.C., AKINC, A., BRAMLAGE, B., BUMCROT, D., FEDORUK, M.N., HARBORTH, J., HEYES, J.A., JEFFS, L.B., JOHN, M., JUDGE, A.D., LAM, K., MCCLINTOCK, K., NECHEV, L.V., PALMER, L.R., RACIE, T., ROHL, I., SEIFFERT, S., SHANMUGAM, S., SOOD, V., SOUTSCHEK, J., TOUDJARSKA, I., WHEAT, A.J., YAWORSKI, E., ZEDALIS, W., KOTELIANSKY, V., MANOHARAN, M., VORNLOCHER, H.P., and MACLACHLAN, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111-114
- 4 - SANTEL, A., ALEKU, M., KEIL, O., ENDRUSCHAT, J., ESCHE, V., FISCH, G., DAMES, S., LOFFLER, K., FECHTNER, M., ARNOLD, W., GIESE, K., KLIPPEL, A., and KAUFMANN, J. (2006). A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther* 13, 1222-1234
- 5 - KIM, S.H., JEONG, J.H., LEE, S.H., KIM, S.W., and PARK, T.G. (2006). PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *Journal of Controlled Release* 116, 123-129
- 6 - MOSCHOS, S.A., WILLIAMS, A.E., and LINDSAY, M.A. (2007). Cell-penetrating-peptide-mediated siRNA lung delivery. *Biochemical Society Transactions* 35, 807-810

7 - TURNER, J.J., JONES, S., FABANI, M.M., IVANOVA, G., ARZUMANOV, A.A., and GAIT, M.J. (2007). RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA. Blood Cells, Molecules, and Diseases 38, 1-7

8 - demande PCT/IB2006/004085 ; WO2007/069092 ; inventeurs : J.P. Behr, M. Kotera, B. Pons, E. Voirin, et J.S. Remy

9 - MOSCHOS, S.A., JONES, S.W., PERRY, M.M., WILLIAMS, A.E., ERJEFALT, J.S., TURNER, J.J., BARNES, P.J., SPROAT, B.S., GAIT, M.J., and LINDSAY, M.A. (2007). Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. Bioconjug Chem 18, 1450-1459

REVENDICATIONS

1 – siRNA cationiques, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments d'ARN double brin, aux extrémités desquels sont greffés des oligocations, le nombre de charges cationiques greffées étant comparable ou supérieur à celui des charges anioniques portées par les phosphates internucléosidiques des brins d'ARN.

2 – siRNA cationiques selon la revendication 1, caractérisés en que la somme totale des charges cationiques des oligocations greffés diminuée de la somme totale des charges anioniques des groupements phosphates internucléosidiques est de -30 à +50.

3 – siRNA cationiques selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que la complémentarité des brins est totale ou partielle dans la double hélice.

4 - siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que chaque oligoribonucléotide présente une extension simple brin en 3' de la double hélice.

5 – siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que les oligocations sont greffés en 3' et/ou 5' du brin sens et/ou en 3' du brin antisens.

6 – siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que lesdits fragments sont constitués d'ARN double brin longs de 15 à 30 nucléotides, en particulier de 19 à 30 nucléotides, aux extrémités desquels sont greffés, par liaison covalente 1 à 3 oligocations dont le nombre total de charges cationiques est comparable ou supérieur au nombre de charges anioniques portées par l'ARN.

7 - siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que un brin au moins brin répond à la formule (I)

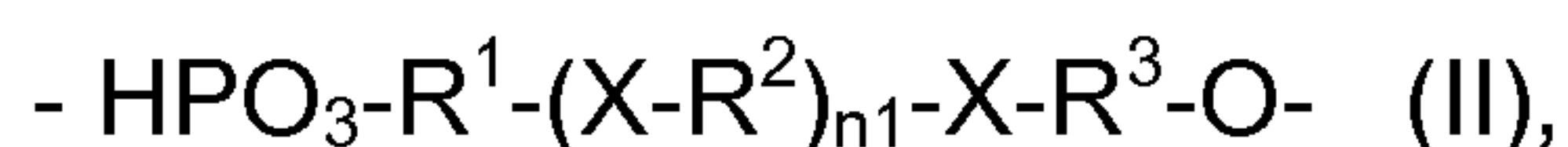


dans laquelle

. Ni représente un oligoribonucléotide i-mère, avec $i = 15$ à 30 , en particulier 19 à 30 , ainsi que toutes modifications chimiques ou substitutions conservant la forme A de la double hélice du siRNA,

.Aj représente une oligocation j-mère, avec $j = 1-50$, A répondant

- à la formule (II)



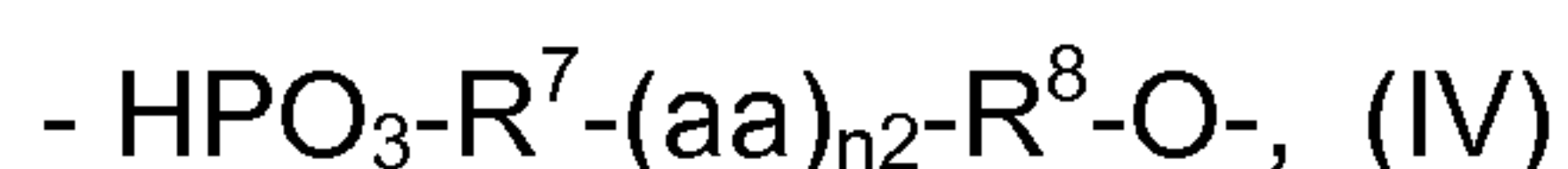
avec R^1 , R^2 et R^3 , identiques ou différents, représentant un radical alkylène inférieur, X étant NH ou $\text{NC(NH}_2\text{)}_2$, $n1 = 2$ à 20 , ou

- à la formule (III)



avec R^4 , R^5 et R^6 , identiques ou différents, représentant un radical alkylène inférieur et X^1 est choisi parmi la putrescine, la spermidine ou la spermine, ou

- à la formule (IV)

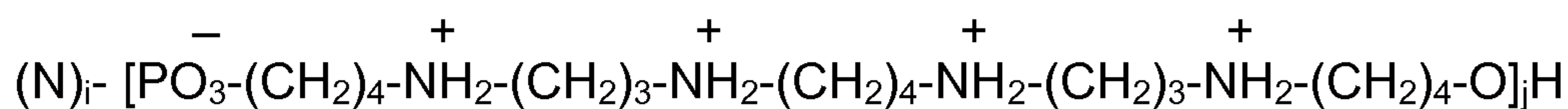


avec R^7 et R^8 identiques ou différents, représentant un radical alkylène inférieur, $(\text{aa})_{n2}$ étant un peptide contenant des acides aminés naturels avec des chaînes latérales cationiques comme l'arginine, la lysine, l'ornithine, l'histidine, l'acide diaminopropionique et $n2 = 2$ à 20 .

8 – siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que les oligocations sont des oligoamines.

9 – siRNA cationiques selon la revendication 8, caractérisés en ce que les oligoamines sont choisies dans le groupe comprenant la spermine, la spermidine ou la putrescine.

10 – siRNA cationiques, selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'il s'agit d'oligonucléotides-oligospermines de structure



dans laquelle N, i et j sont tels que définis dans la revendication 7.

11 – siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour une utilisation comme médicaments.

12 – Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un siRNA cationique, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte, un lipide cationique ou un polymère cationique.

13 – Application des siRNA cationiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, en biologie moléculaire et génomique fonctionnelle.

14 – Procédé de synthèse automatisé d'un brin de siRNA cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend :

le couplage séquentiel 3' vers 5' de 19 à 30 ribonucléotides sur support solide, précédé et/ou suivi du couplage séquentiel de synthons cationiques, le brin répondant à la formule (VI)



avec N, i, A, et j tels que dans la revendication 7.

15 – Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les synthons cationiques sont des oligoamines phosphoramidites et répondent

- à la formule (VII)



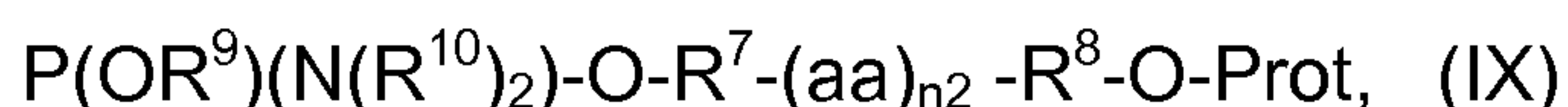
dans laquelle R^1 , R^2 , R^3 , n_1 sont tels que définis ci-dessus, X est un groupe NH ou $NC(NH_2)_2$ protégé, R^9 est $-CH_2CH_2CN$, ou un radical alkylène inférieur, R^{10} est un radical alkylène inférieur, ou $-N(R^{10})_2$ est un radical pyrrolidino, pipéridino ou morpholino et Prot est un groupe protecteur utilisé en synthèse oligonucléotique, tel que DMT, MMT; ou

- à la formule (VIII)



dans laquelle R^4 , R^5 , R^6 identiques ou différents, représentent un radical alkylène inférieur, X^1 est une putrescine, spermidine ou spermine avec des groupements protecteurs appropriés, R^9 et R^{10} sont tels que définis ci-dessus; ou

- à la formule (IX)



dans laquelle R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , n_2 , et Prot sont comme défini ci-dessus, $(aa)_{n_2}$ est un peptide contenant des acides amines naturels avec des chaînes latérales cationiques protégés, comme l'arginine, la lysine, l'ornithine, l'histidine, l'acide diaminopropionique et $n_2 = 2$ à 20.

Figure 1

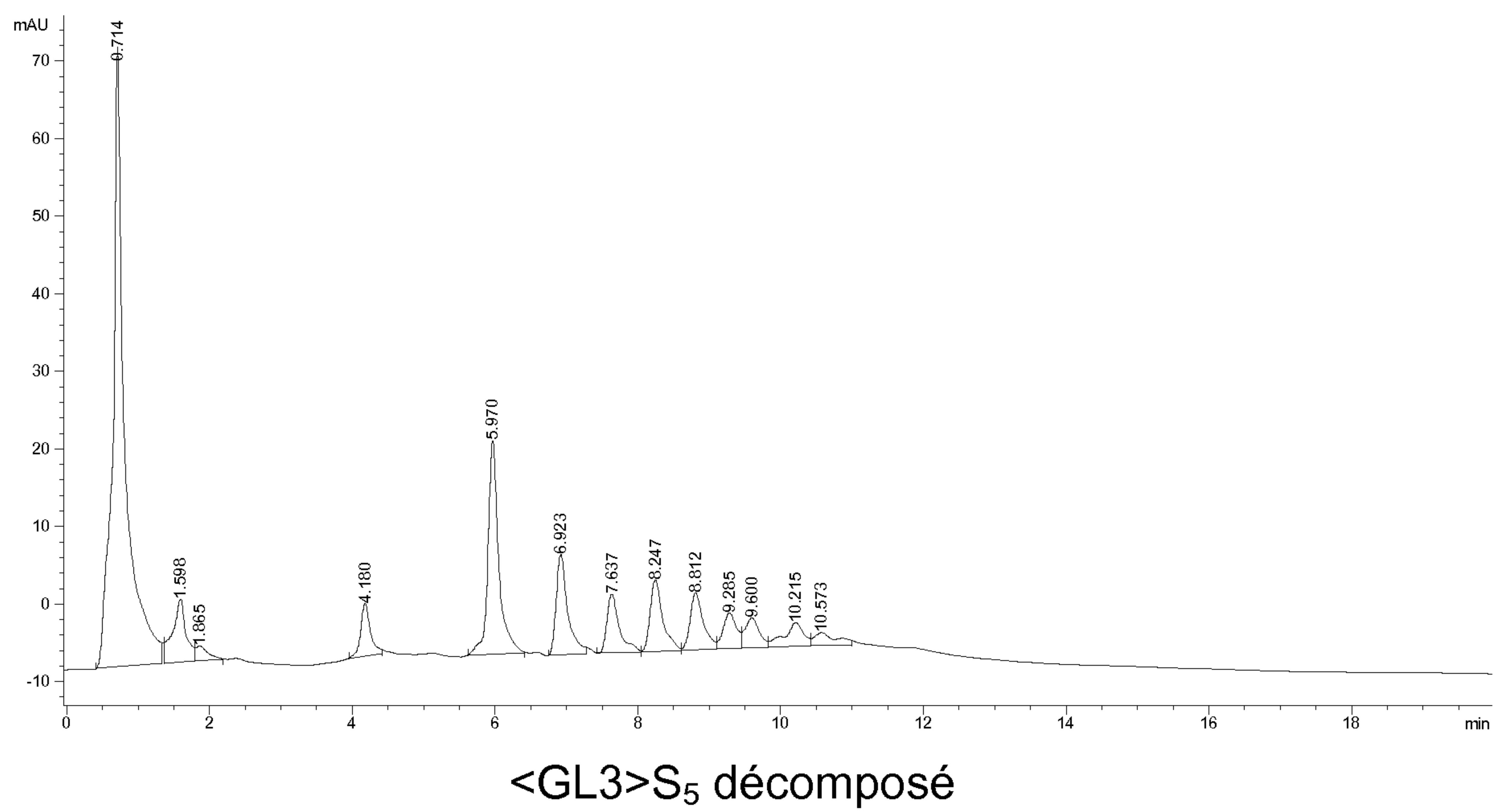
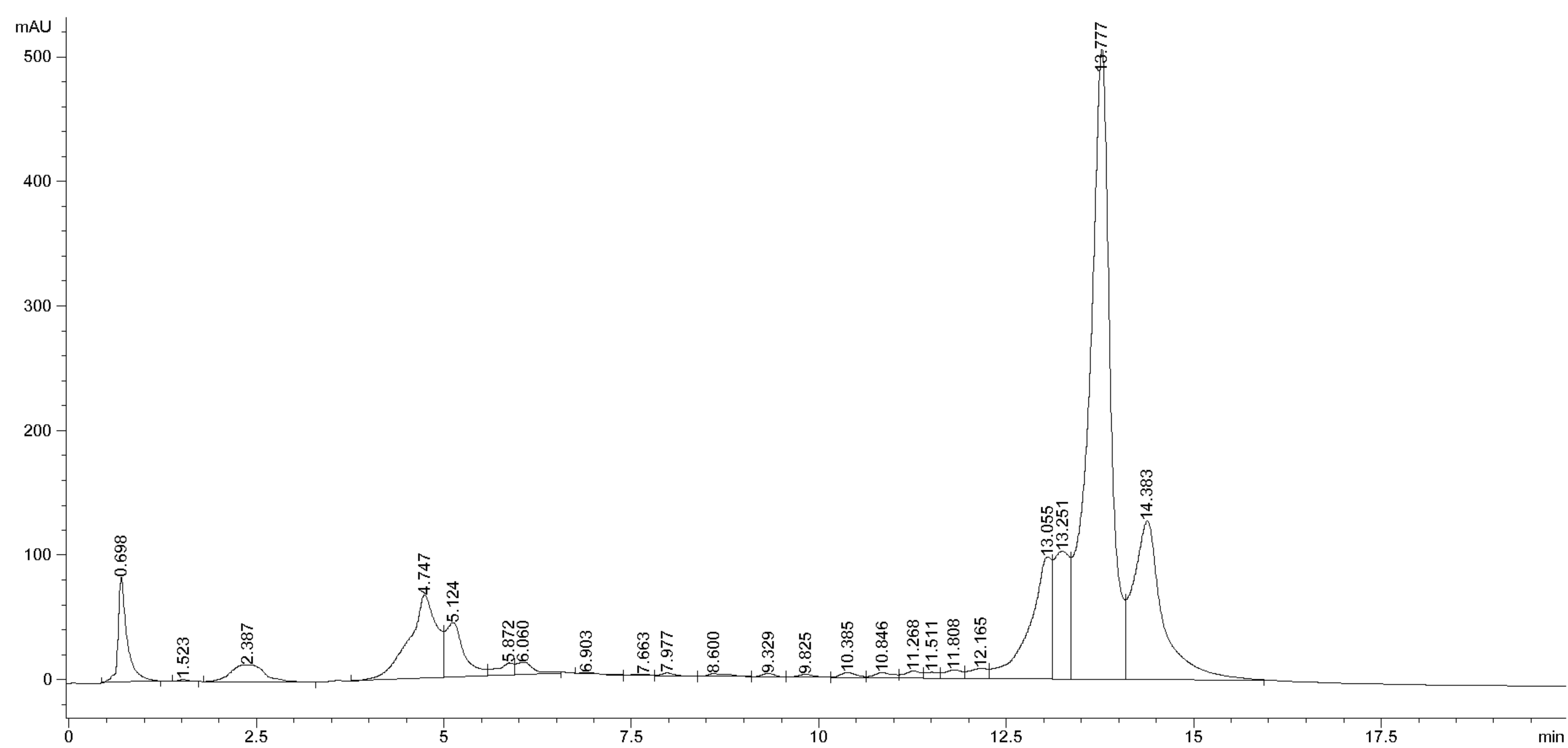


Figure 2



<GL3ss>

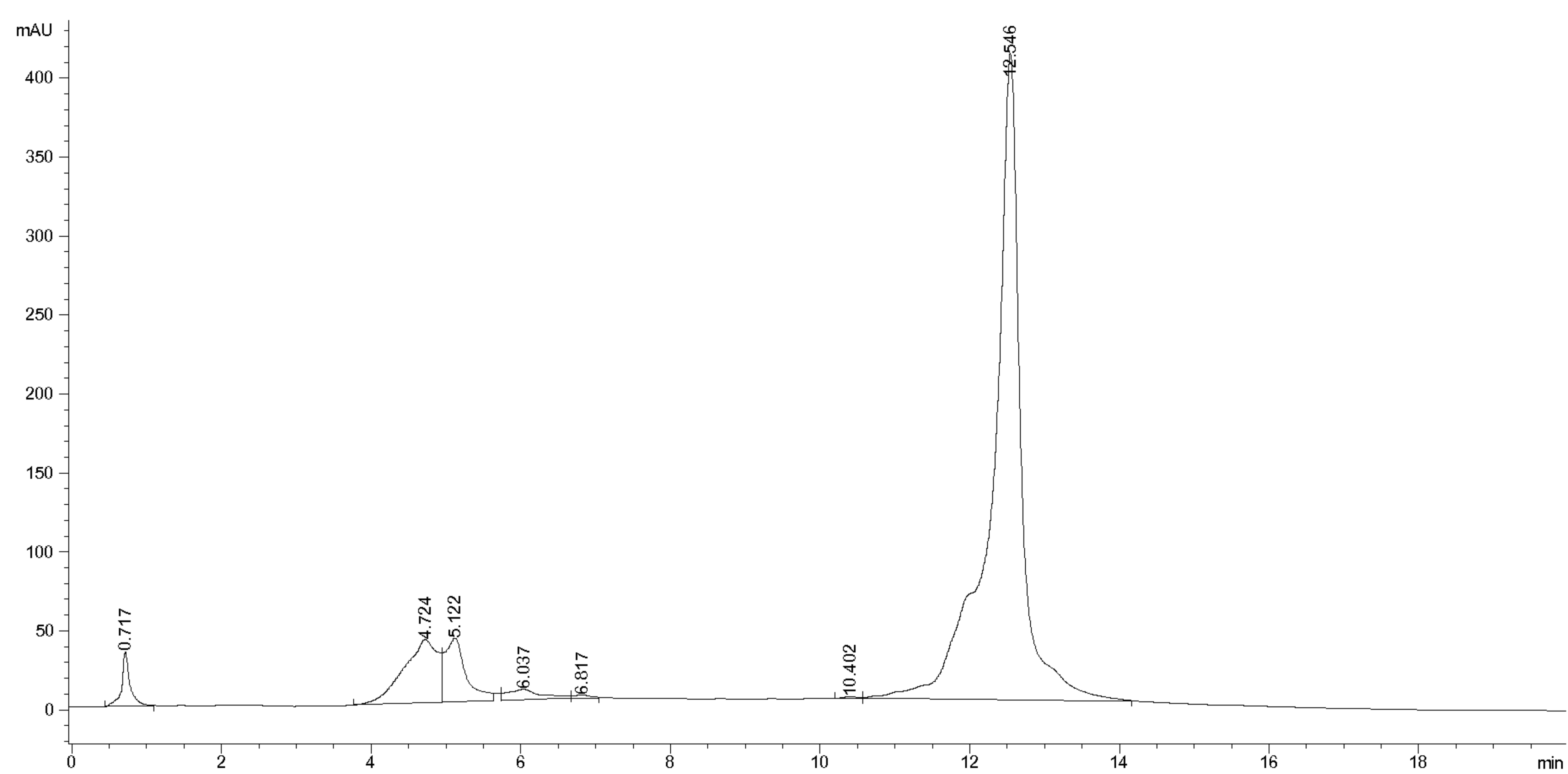
<GL3ss>S₁

Figure 2 (suite)

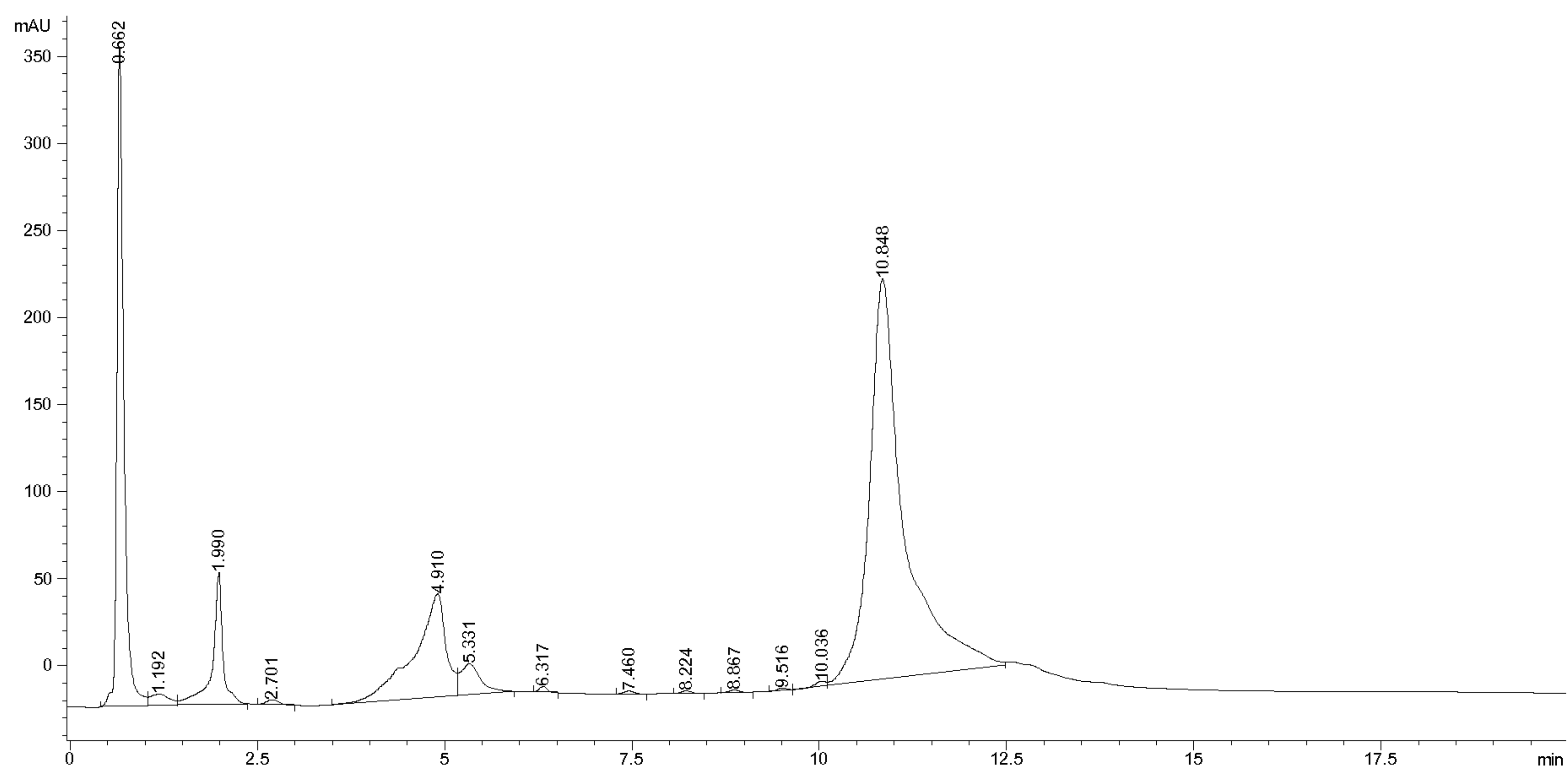
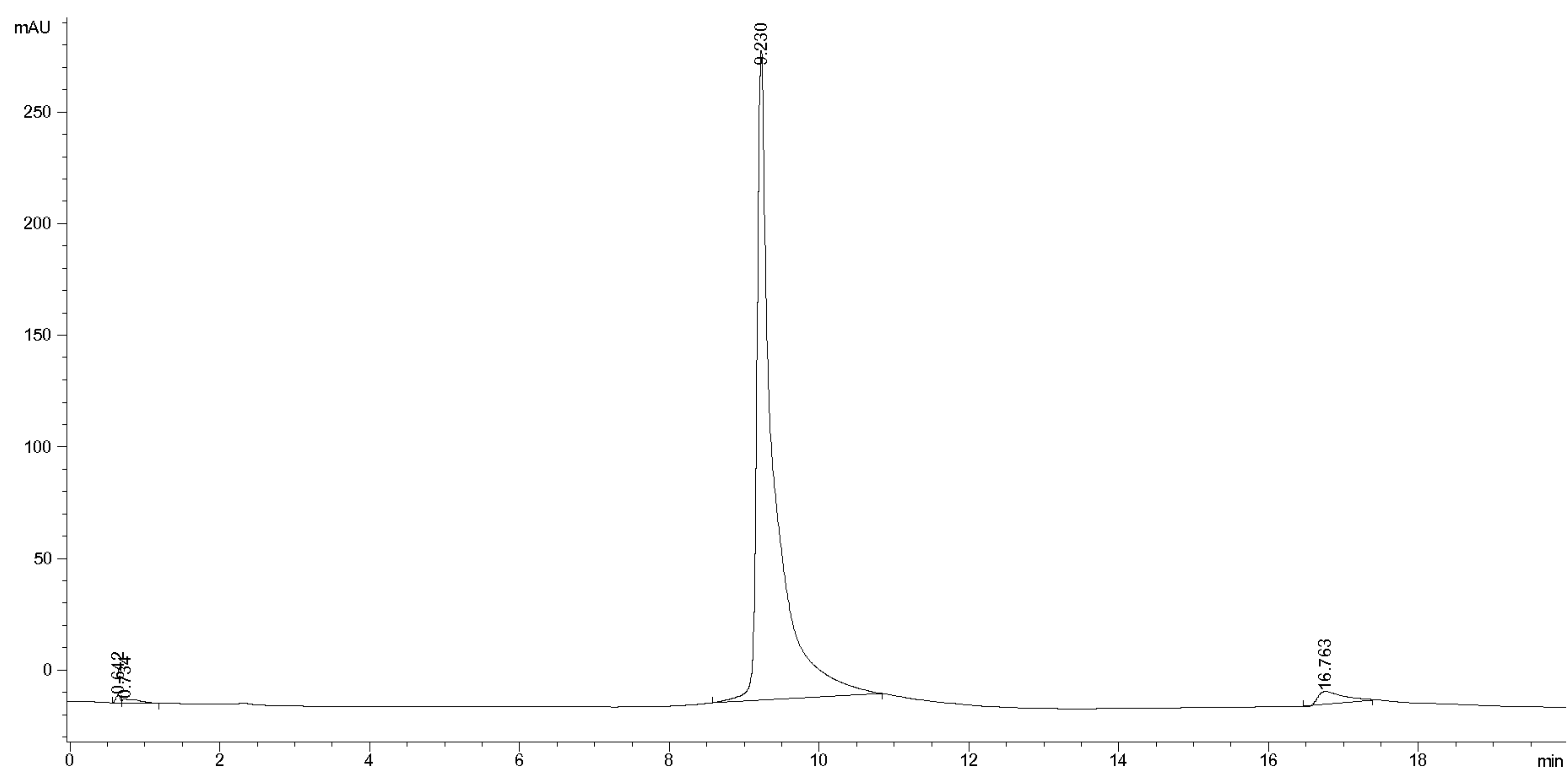
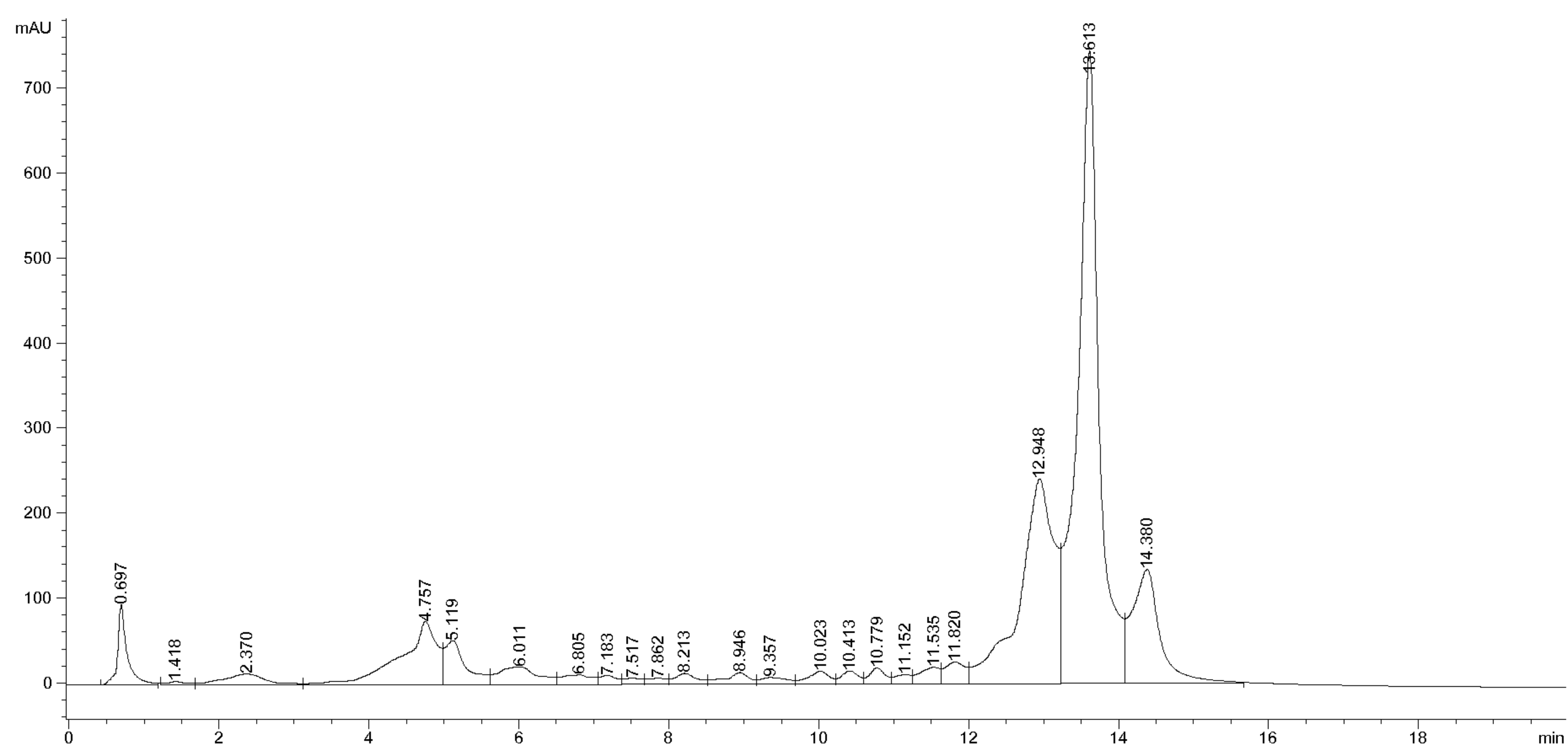
<GL3ss>S₃<GL3ss>S₅

Figure 2 (suite)



<GL3as>

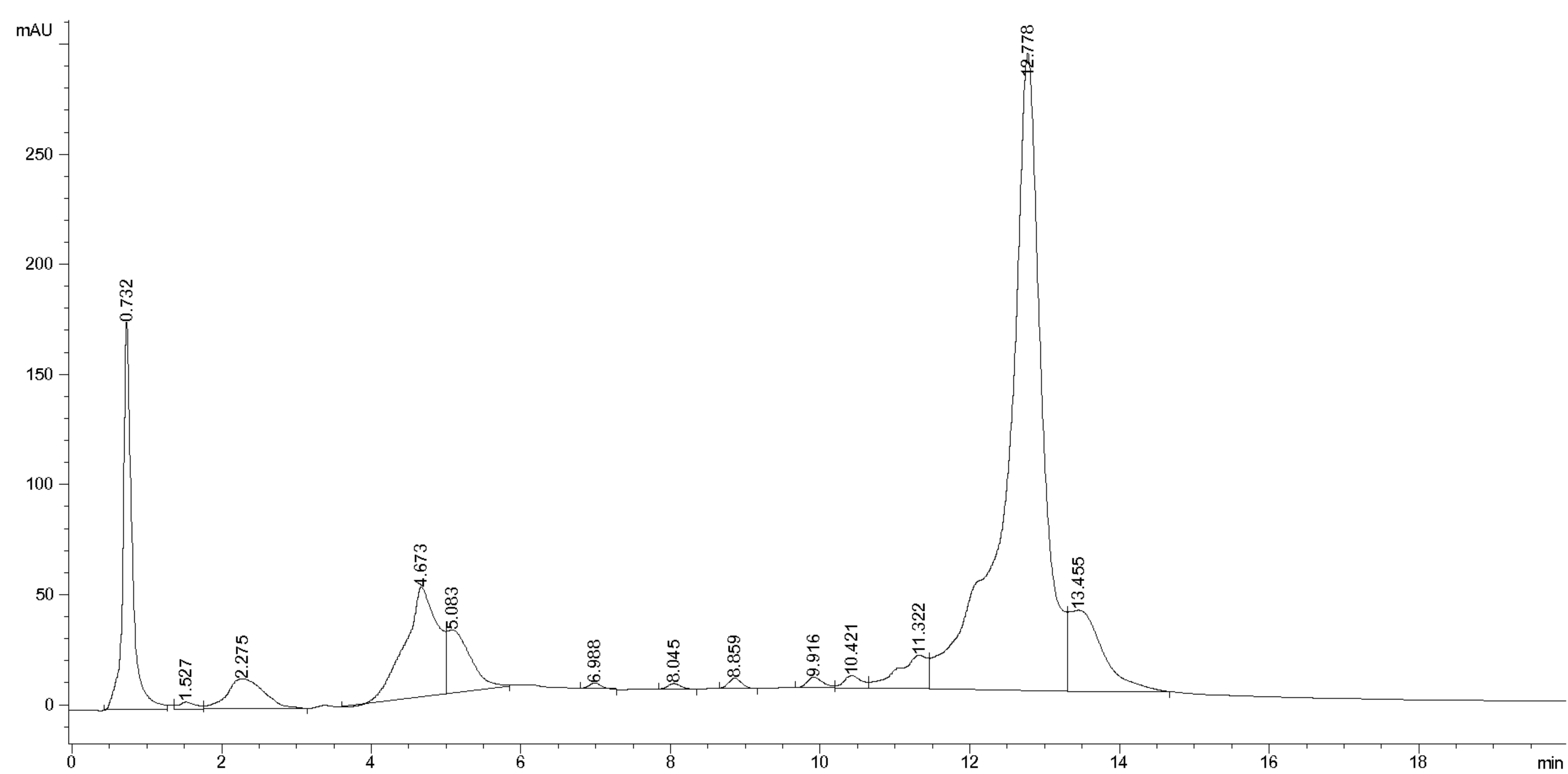
<GL3as>S₁

Figure 3

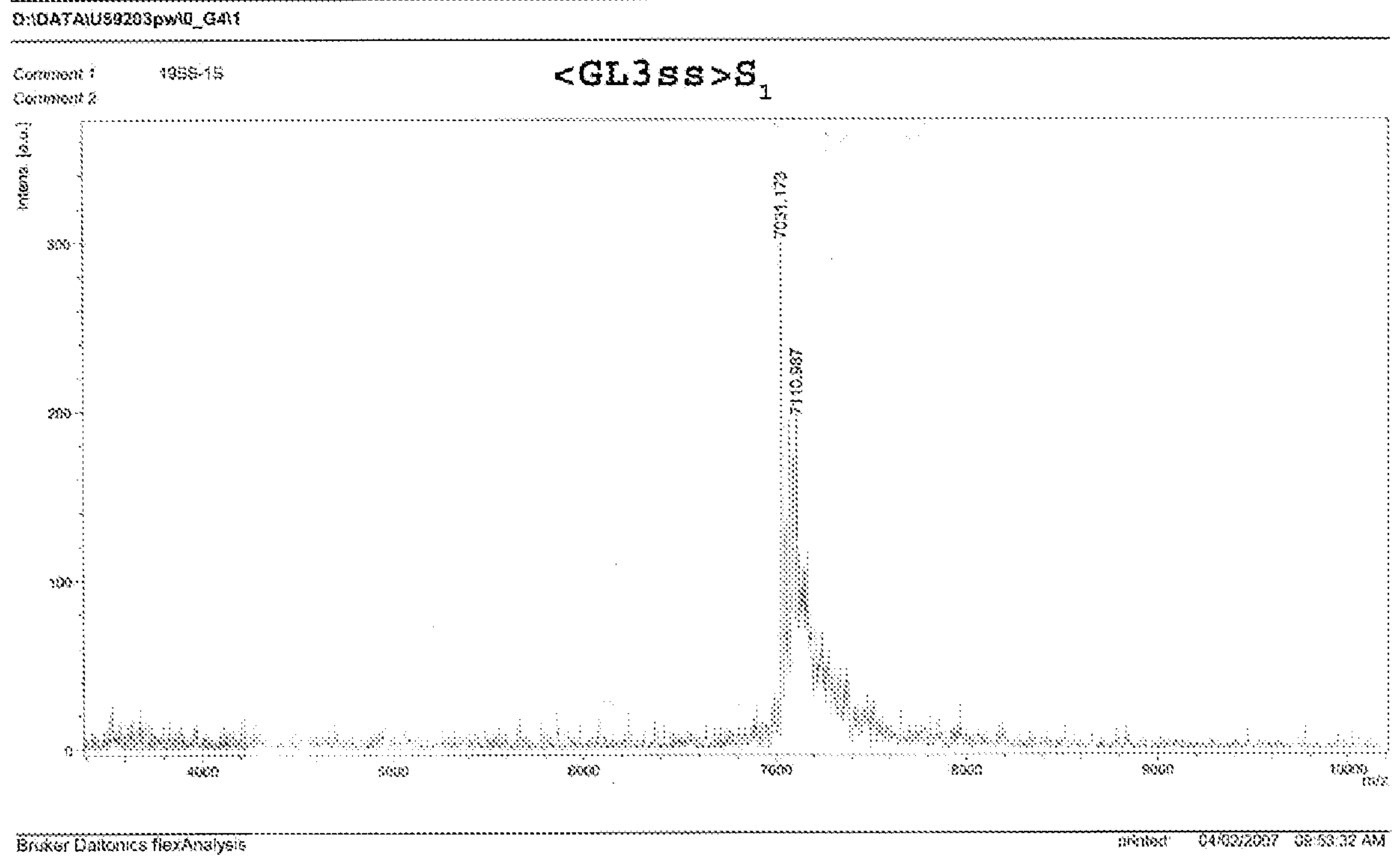
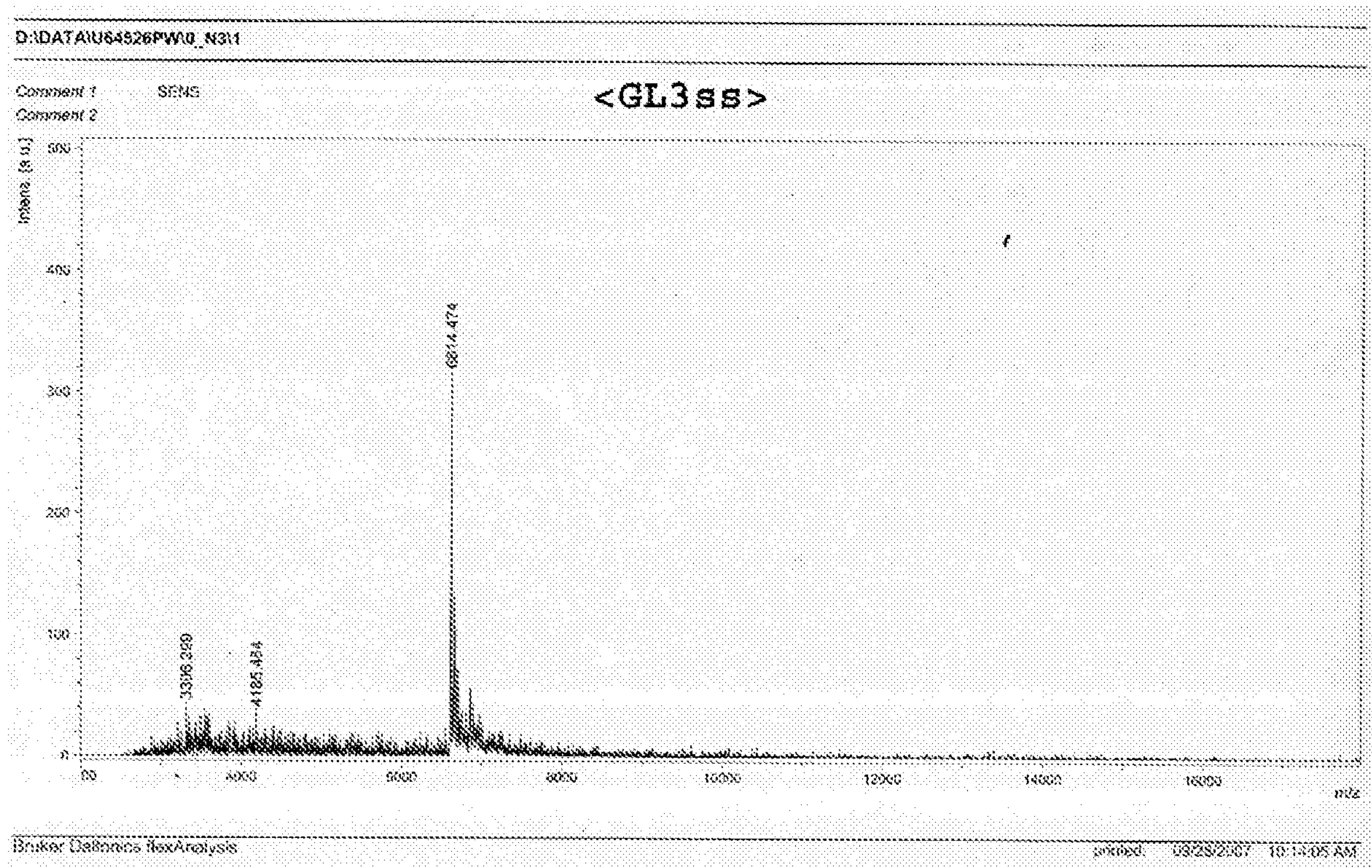


Figure 3 (suite)

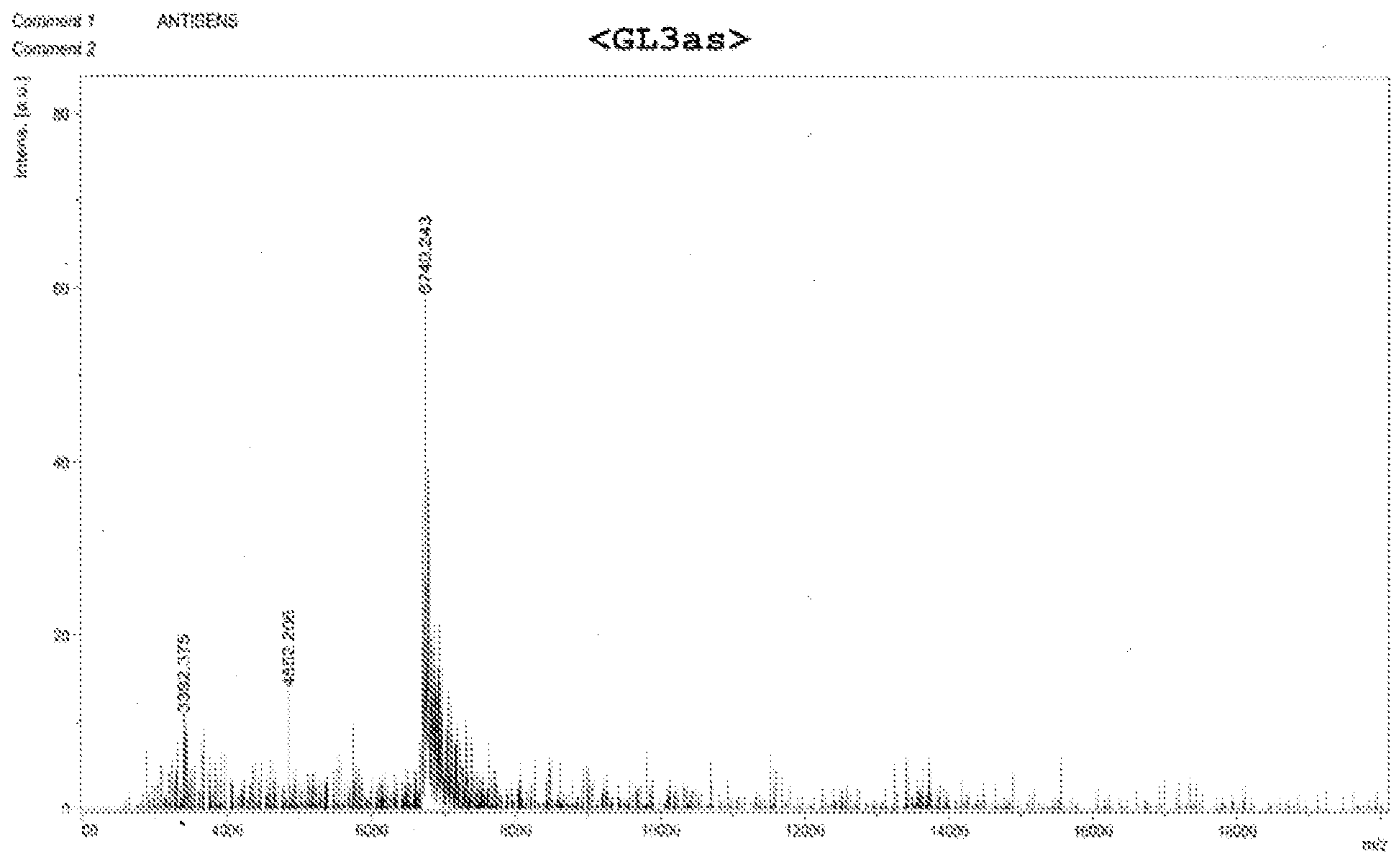
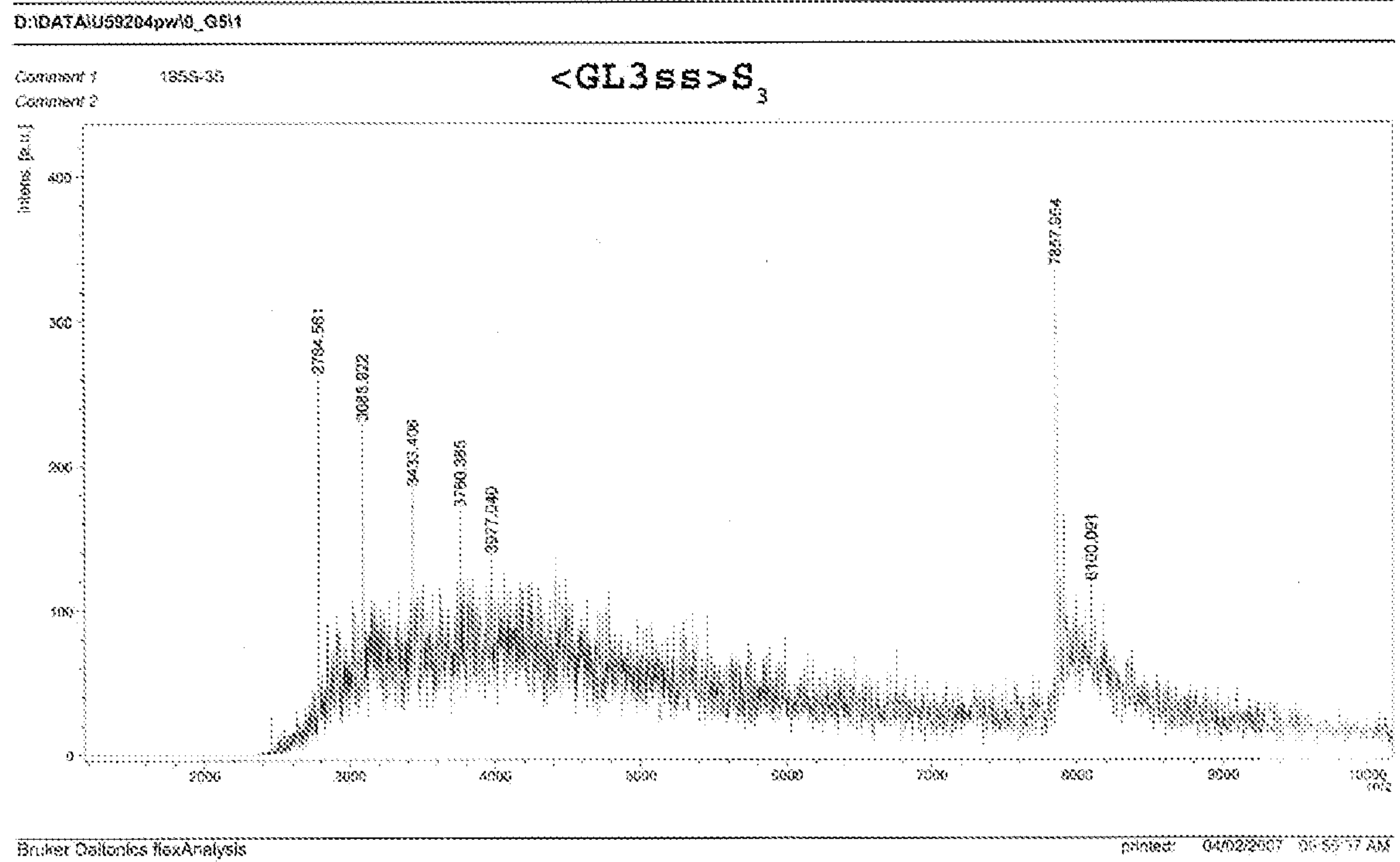
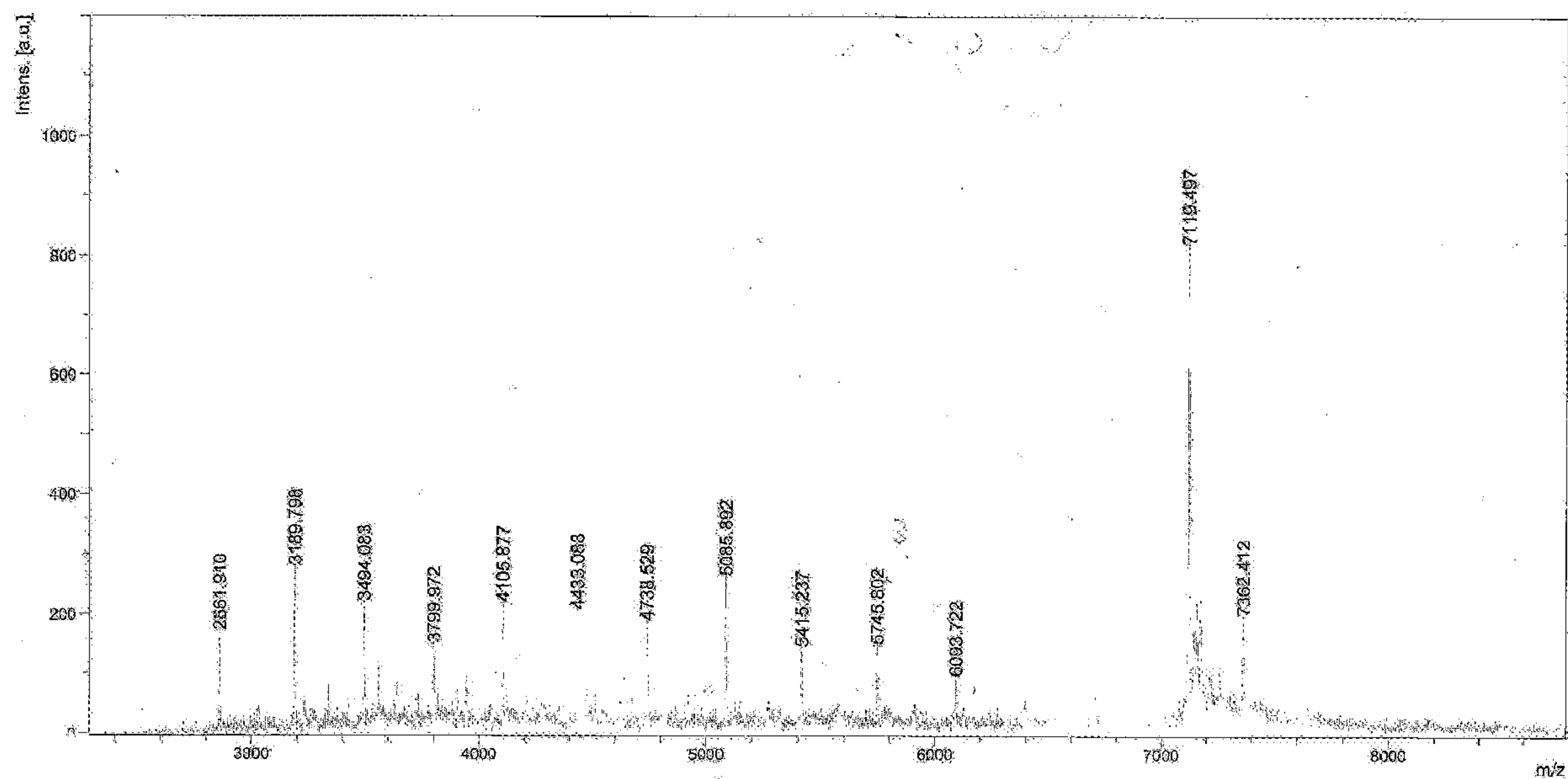


Figure 3 (suite)

D:\DATA\U59202pw\0_G3\1

Comment 1 19ASS-1S
Comment 2<GL3as>S₁

Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 04/02/2007 09:56:42 AM

Comment 1 GL2SENS
Comment 2

<GL2ss>

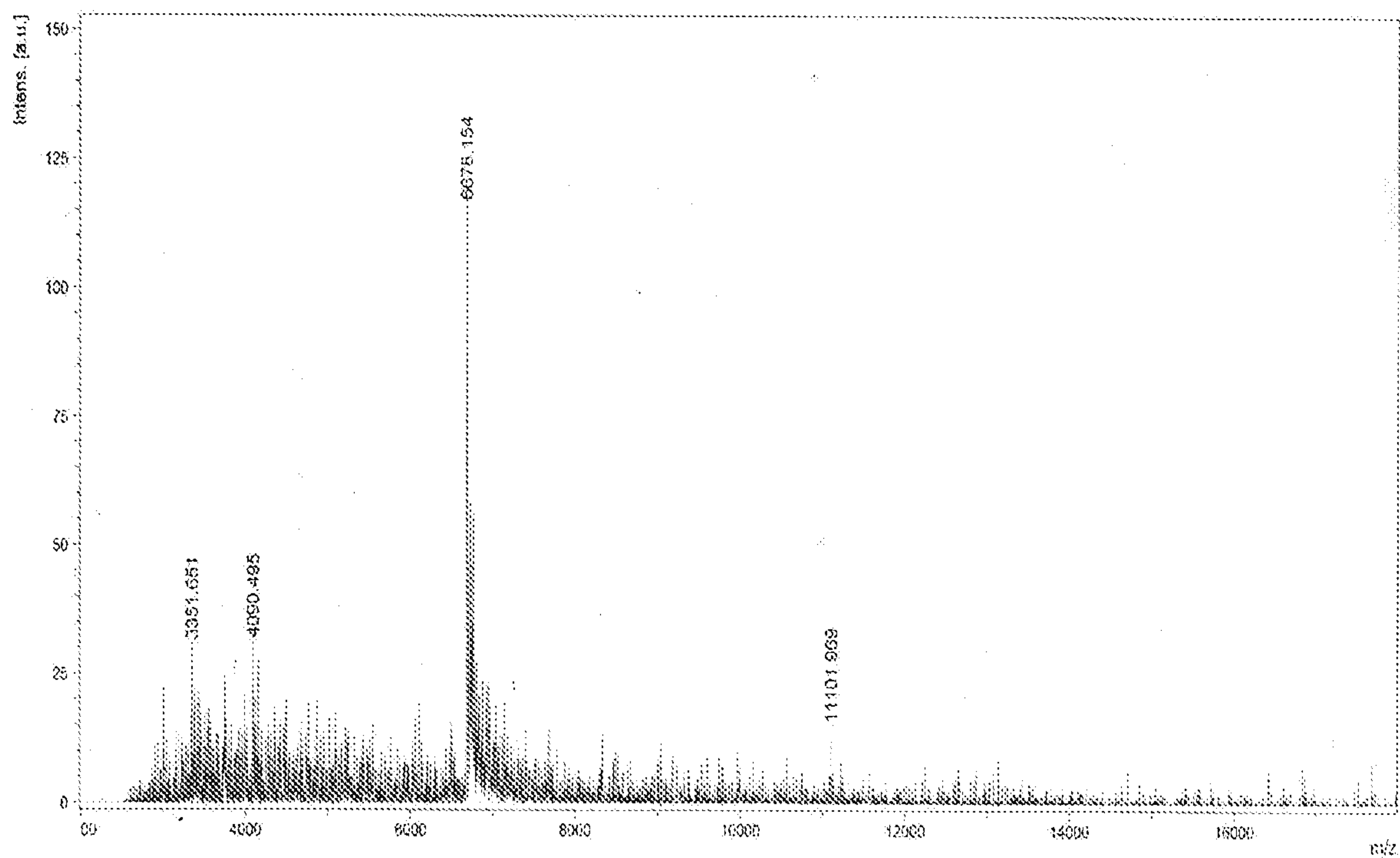


Figure 4

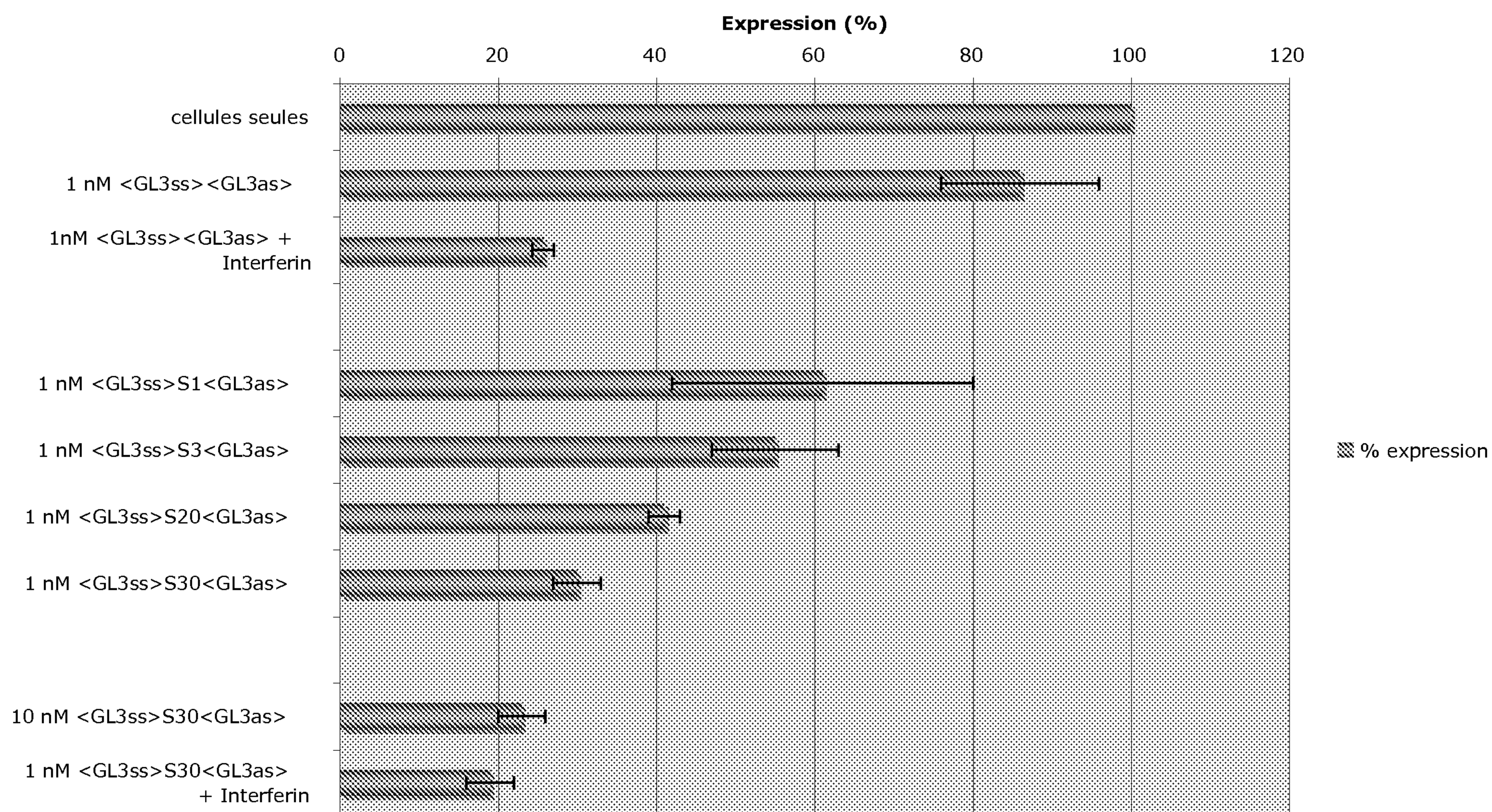


Figure 5

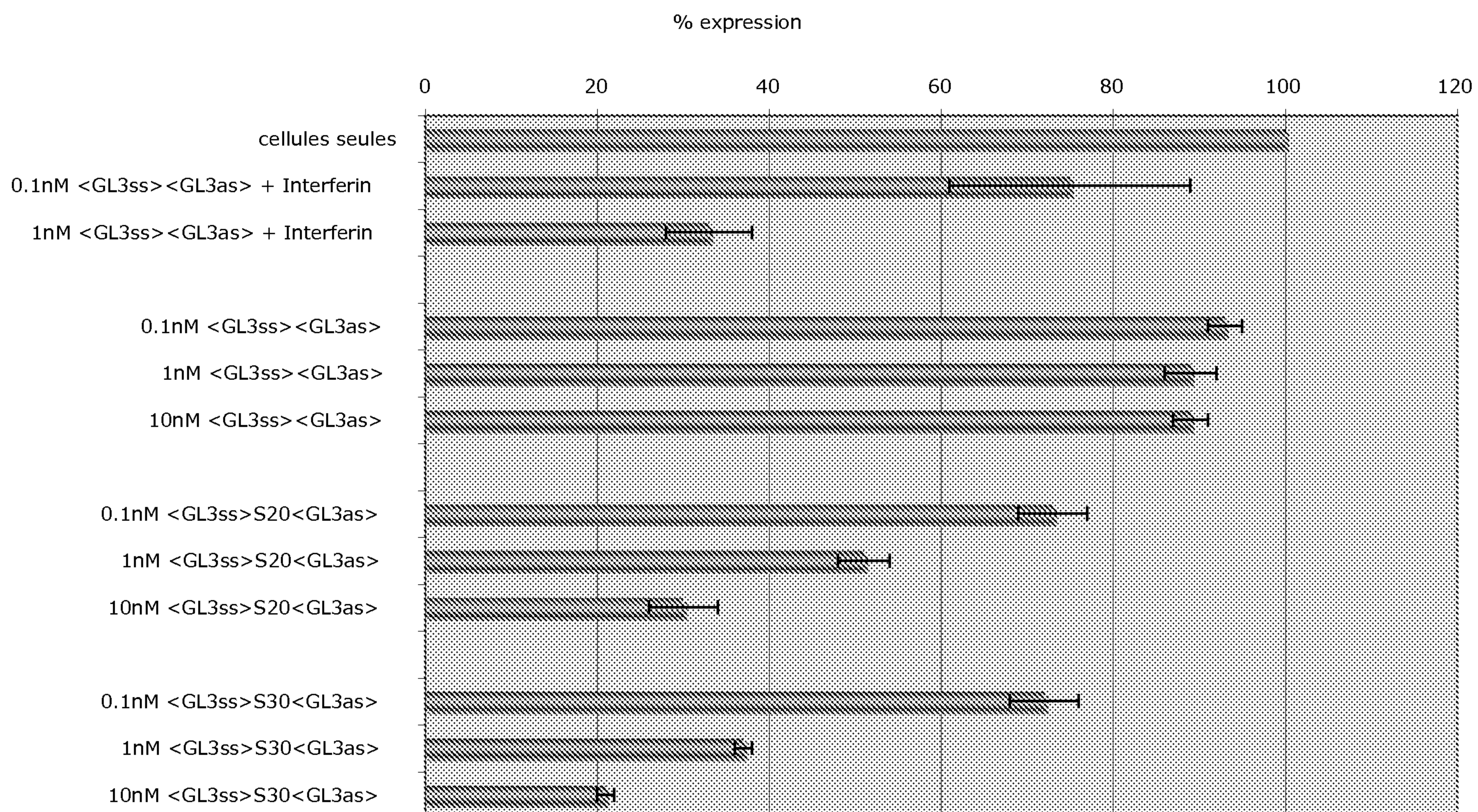


Figure 6

