

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 902 439**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **06 05304**

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 N 15/10 (2006.01), C 12 N 15/70, C 12 P 19/34,
A 61 K 48/00, 31/7088

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 14.06.06.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.12.07 Bulletin 07/51.

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) : UNIVERSITE RENE DESCARTES
(PARIS V) Etablissement public — FR et CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : DARDEL FREDERIC et PONCHON
LUC.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 ARN DE TRANSFERT CHIMÉRIQUE ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION D'ARN PAR UNE
CELLULE.

⑤7 La présente invention concerne l'utilisation d'un acide
nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique,
lequel ARNt chimérique provient de la modification d'un
ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'antico-
don dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de
la tige boucle de l'anticodon dudit l'ARNt par un ARN, pour
la production dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans
une cellule.

FR 2 902 439 - A1



La présente invention concerne, en particulier, l'utilisation d'un ARNt chimérique, comprenant un ARN, pour la production dudit ARN par une cellule.

A l'heure actuelle, la production d'ARN en grandes quantités fait appel, pour l'essentiel, à trois technologies distinctes : la synthèse chimique, la synthèse enzymatique *in vitro*, et la purification d'ARN produits *in vivo*.

La synthèse chimique (Marshall & Kaiser (2004), *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** : 222-229) permet de produire une molécule d'ARN dans des quantités de l'ordre de 100 µg à 10 mg. Cette technologie est cependant limitée à des molécules relativement courtes, comprenant en général moins de 50 ribonucléotides, et ce d'autant plus que la synthèse est réalisée à grande échelle, *i.e.* pour des quantités supérieures au milligramme. Cette technologie est en outre relativement coûteuse.

La synthèse enzymatique *in vitro* permet de produire des molécules d'ARN en utilisant une enzyme purifiée, une matrice d'ADN et des ribonucléotides triphosphates (Milligan *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* **15** : 8783-8798). Contrairement à la synthèse chimique il n'y a pas de limite de taille des molécules synthétisées. Toutefois, pour de grandes quantités, son utilisation reste délicate avec des rendements de production très variables et fortement dépendants de la séquence des molécules d'ARN à produire. De plus, la purification s'avère laborieuse et nécessite notamment de multiples électrophorèses et électroélutions. Cette technologie est également relativement coûteuse.

Enfin, la purification d'ARN produits *in vivo* permet principalement d'obtenir des molécules d'ARN naturellement produites par les cellules et relativement abondantes, telles que des ARNt (Meinzel *et al.* (1988) *Nucl. Acids Res.* **16** : 8095-8096 ; Normanly *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83** : 6548-6552 ; Tisne *et al.* (2000) *RNA* **6** : 1403-1412), la partie ribonucléotidique de la ribonucléase P (Meinzel & Blanquet (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 15908-15914) ou l'ARNtm (Gaudin *et al.* (2003) *J. Mol. Biol.* **331** : 457-471). Cette technologie n'a jamais été appliquée systématiquement à des ARN autre que des ARN naturels, notamment en raison d'obstacles techniques prévisibles importants comme l'instabilité des ARN produits, la faiblesse du rendement d'expression ou les difficultés de purification.

Un objet de l'invention est donc de fournir un moyen de production d'ARN dépourvu des inconvénients rencontrés pour les technologies mentionnées ci-dessus.

Les ARNt sont des molécules fondamentales de la biosynthèse peptidique qui, une fois chargés de leurs acides aminés respectifs par les aminoacyl-ARNt synthétases, assurent, grâce au ribosome, la traduction du message génétique porté par les ARN messagers en séquences peptidiques (Hopper & Phisicky (2003),
5 *Genes dev.* **17** :162-180).

Le document Medina & Joshi (1999) *Nucl. Acids Res.* **27** : 1698-1708 décrit un ARNt chimérique dans lequel un ribozyme est inséré entre deux bases successives de la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Lys}₃ humain. Toutefois, cet ARNt chimérique est produit *in vitro* avec les inconvénients inhérents à cette technologie mentionnés ci-
10 dessus.

La présente invention découle de la mise en évidence inattendue qu'il est possible de produire des quantités importantes d'une molécule d'ARN à partir de cellules exprimant un ARNt modifié, par exemple de façon qu'une partie de la tige-boucle de l'anticodon soit remplacée par la séquence codante de la molécule d'ARN.
15 L'ARNt modifié contenant la molécule d'ARN est aisément purifié, en grande quantité, à partir des cellules, la molécule d'ARN à produire pouvant ensuite être excisée de l'ARNt chimérique.

La présente invention concerne ainsi l'utilisation d'un acide nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique, lequel ARNt chimérique provient de la
20 modification d'un ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de la tige boucle de l'anticodon dudit l'ARNt par un ARN, pour la production dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans une cellule.

Comme on l'entend ici, le terme « production » de l'ARN se réfère à la
25 production de l'ARN en lui-même, ou d'une partie de cet ARN, mais également à la production de l'ARN au sein de l'ARNt chimérique ou d'une partie de cet ARNt chimérique. De préférence, la production se fait à partir de la transcription de l'acide nucléique par la cellule. La transcription de l'acide nucléique conduit à l'ARNt chimérique. Si nécessaire, cet ARNt chimérique peut être clivé dans ou hors de la
30 cellule pour libérer l'ARN.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'ARN défini ci-dessus substitue tout ou une partie de la tige-boucle de l'anticodon comprise entre le premier ribonucléotide, inclus, de la tige-boucle de l'anticodon et le dernier ribonucléotide, inclus, de la tige-boucle de l'anticodon.

L'utilisation selon l'invention d'un acide nucléique codant ARNt chimérique tel que défini ci-dessus dans le cadre de la production de l'ARN est particulièrement avantageuse car la présence de la partie ARNt, ou châssis ARNt, permet notamment de produire l'ARN (inclus dans l'ARNt chimérique) avec un rendement supérieur à celui qui serait obtenu en l'absence de la partie ARNt, et de protéger l'ARN (inclus dans l'ARNt chimérique) d'une dégradation, notamment liée à certains composants cellulaires.

ARNt

Les caractéristiques générales d'un ARNt sont bien connues de l'homme du métier.

D'une manière préférée, un ARNt est formé d'une unique chaîne ribonucléotidique qui est susceptible de se replier pour adopter une structure secondaire caractéristique dite en trèfle. Cette structure secondaire caractéristique comprend :

- (i) une tige acceptrice composée des 7 premiers ribonucléotides du côté 5' de la chaîne ribonucléotidique et des 7 ribonucléotides précédant les 4 derniers ribonucléotides du côté 3' de la chaîne ribonucléotidique, formant ainsi une structure double brin comprenant 6 ou 7 paires de ribonucléotides, les ribonucléotides constitués par le premier ribonucléotide du côté 5' de la chaîne ribonucléotidique et le ribonucléotide précédant les 4 derniers ribonucléotides du côté 3' de la chaîne ribonucléotidique pouvant ne pas être appariés ;
- (ii) un bras D constitué de 4 paires de ribonucléotides et une boucle D constituée de 8 à 10 ribonucléotides, formés par le repliement d'une partie de la chaîne ribonucléotidique suivant les 7 premiers ribonucléotides du côté 5' de la chaîne ribonucléotidique ;
- (iii) une tige de l'anticodon constituée de 5 paires de ribonucléotides et une boucle de l'anticodon constituée de 7 ribonucléotides (tige-boucle de l'anticodon), formées par le repliement d'une partie de la chaîne ribonucléotidique suivant le bras D et la boucle D ;
- (iv) une boucle variable constituée de 4 à 21 ribonucléotides, formée par une partie de la chaîne ribonucléotidique suivant le tige de l'anticodon et la boucle de l'anticodon ;
- (v) un bras T constitué de 5 paires de ribonucléotides et une boucle T constituée de 8 ribonucléotides, formés par le repliement d'une partie de la chaîne

ribonucléotidique suivant la boucle variable et précédant les ribonucléotides du côté 3' de la chaîne ribonucléotidique qui participent à la constitution de la tige acceptrice.

Comme on l'entend ici, une paire de ribonucléotides est formée de l'appariement non covalent des bases puriques et pyrimidiques des deux
5 ribonucléotides grâce à des liaisons faibles, telles que des liaisons hydrogènes, qui peuvent notamment être des liaisons de type Watson-Crick bien connues de l'homme du métier.

De manière préférée également, depuis le côté 5' en direction du côté 3', 2 ribonucléotides sont présents entre les 7 premiers ribonucléotides du côté 5' de la chaîne ribonucléotidique et le bras et la boucle D, 1 ribonucléotide est présent entre
10 le bras et la boucle D, d'une part, et la tige et la boucle de l'anticodon, d'autre part, 1 ribonucléotide est présent entre tige et la boucle de l'anticodon, d'une part, et la boucle variable, d'autre part.

De manière préférée toujours, et selon la numérotation bien connue de
15 l'homme du métier définie par Sprinzl *et al.* (1998) "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes". *Nucleic Acids Res.* **26** : 148–153, l'ARNt comprend 17 ribonucléotides, assurant la structure tridimensionnelle de l'ARNt et la reconnaissance par les enzymes cellulaires, à savoir : U₈, A₁₄, (A ou G)₁₅, G₁₈, G₁₉, A₂₁, G₅₃, U₅₄, U₅₅, C₅₆, (A ou G)₅₇, A₅₈, (C ou U)₆₀, C₆₁, C₇₄, C₇₅, A₇₆. Les
20 ribonucléotides indiqués correspondent à la séquence de l'ARNt tel que transcrit avant modifications post-transcriptionnelles éventuelles de certains ribonucléotides par la machinerie cellulaire.

En particulier, l'ARNt défini ci-dessus peut-être sélectionné parmi le groupe constitué des ARNt d'archée, de bactérie, de virus, de protozoaire, de champignon,
25 d'algue, de plante ou d'animal.

Les ARNt utilisables selon l'invention comprennent également l'ensemble des ARNt décrit par Sprinzl *et al.* (1998) "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes". *Nucleic Acids Res.* **26** : 148–153 ou ceux disponibles sur le site : <http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>.

30 Dans le cadre de l'invention, le terme « ARNt » englobe également des structures obtenues en modifiant un ARNt tel qu'il est défini ci-dessus ou des variants naturels d'un ARNt tel qu'il est défini ci-dessus, sous réserve que ces structures modifiées ou ces variants conservent les fonctionnalités de l'ARNt non modifié, à savoir notamment l'interaction avec des protéines telles que le facteur EF-

Tu (voir par exemple Rodnina *et al.* (2005) *FEBS. Lett.* **579** : 938-942) ou la CCAsé (voir par exemple Augustin *et al.* (2003) *J. Mol. Biol.* **328** : 985-994)

ARN

L'ARN selon l'invention est une chaîne ribonucléique quelconque, qui de
5 préférence comprend de 6 à 5 000 ribonucléotides, plus préférentiellement de 6 à
1 000 ribonucléotides, et plus préférentiellement encore de 6 à 300 ribonucléotides.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, tout ou partie de
l'ARN défini ci-dessus est choisi dans la liste constituée d'un ARN antisens, d'un
ARN interférent, d'un aptamère, d'un ribozyme, d'un ARN viral, d'un ARN
10 ribosomique, et d'un ARN nucléolaire.

On désigne par « ARN antisens » un ARN susceptible de se lier à une
séquence nucléique cible (ADN ou ARN) de façon à limiter ou à empêcher son
fonctionnement, en particulier les ARN antisens peuvent se lier à un ARN messager
cible de façon à empêcher sa traduction (voir par exemple Tafech *et al.* (2006) *Curr.*
15 *Med. Chem.* **13** : 863-881).

On désigne par « ARN interférent » un ARN susceptible d'empêcher ou de
limiter l'expression d'un gène cible par le phénomène d'interférence (voir par
exemple Tafech *et al.* (2006) *Curr. Med. Chem.* **13** : 863-881).

On désigne par « aptamère » un ARN susceptible de se lier à un composé
20 cible, telle qu'une macromolécule biologique, par exemple de nature protéique. (voir
par exemple Nimjee *et al.* (2005) *Ann. Rev. Med.* **56** : 555-583).

On désigne par « ribozyme » un ARN susceptible de catalyser une ou
plusieurs réactions chimiques (voir par exemple Fiammenga & Jaschke (2005) *Curr.*
Opin. Biotechnol. **16** : 614-621).

25 On désigne par « ARN viral » un ARN ou une partie d'ARN portée ou codée
par un virus.

On désigne respectivement par « ARN ribosomique » et « ARN nucléolaire »,
un ARN ou une partie d'ARN constitutif du ribosome ou du nucléole.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'ARN est
30 structuré.

On désigne par « ARN structuré » un ARN susceptible d'adopter une structure
secondaire et éventuellement une structure tertiaire préférentielle.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'ARN comprend une étiquette de purification, l'étiquette de purification étant de préférence choisie dans le groupe constitué d'un ribozyme ou d'un aptamère.

5 On désigne par « étiquette de purification » un motif, de préférence de nature ribonucléotidique, susceptible de favoriser la séparation, par exemple une séparation par affinité, de l'ARNt chimérique qui le comprend, du milieu dans lequel il se trouve.

Le ribozyme est de préférence choisi dans le groupe constitué d'un ribozyme en épingle à cheveux (*hairpin*), d'un ribozyme à tête de marteau (*hammerhead*) ou d'un leadzyme (voir par exemple Doherty & Doudna (2000) *Ann. Rev Biochem.* **69** :
10 597-615).

L'aptamère est de préférence choisi dans le groupe constitué d'un aptamère de liaison à l'avidine, au dextran (sephadex™), à la biotine ou à l'arginine.

ARNt chimérique

15 De préférence, lorsque l'ARN substitue tout ou une partie de la tige-boucle de l'anticodon comprise entre le premier ribonucléotide, inclus, de la tige-boucle de l'anticodon et le dernier ribonucléotide, inclus, de la tige-boucle de l'anticodon, l'ARNt chimérique est tel que les deux ribonucléotides qui suivent le ribonucléotide qui précède la tige-boucle de l'anticodon dans l'ARNt avant modification sont appariés
20 avec les deux ribonucléotides qui précèdent le ribonucléotide qui suit la tige boucle de l'anticodon dans l'ARNt avant modification. Ainsi, dans un cas particulier, l'ARNt chimérique est tel que les deux paires de bases de l'extrémité de la tige de l'anticodon dirigée vers le bras T et le bras D de l'ARNt sont conservées. Dans un
25 autre cas particulier l'ARNt chimérique est tel que les deux premiers ribonucléotides de l'ARN s'apparient aux deux derniers ribonucléotides de l'ARN.

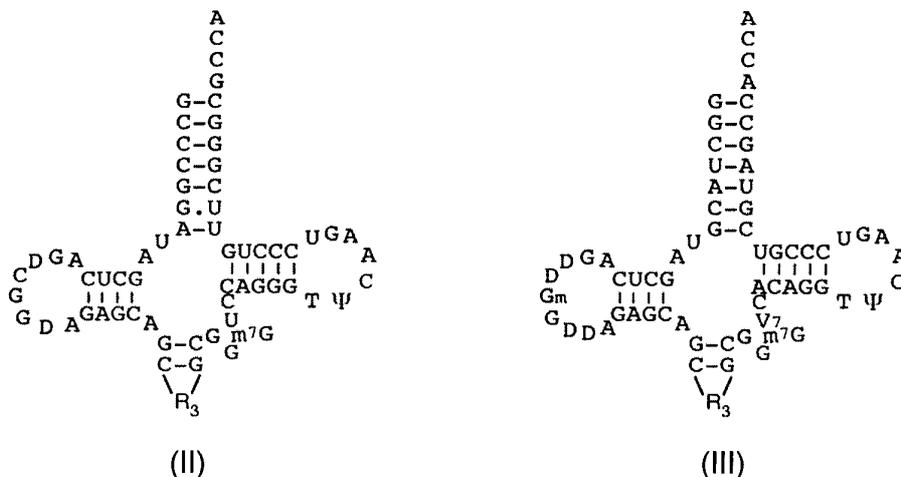
De préférence, l'ARNt chimérique défini ci-dessus présente la formule (I) suivante :

considéré dans l'ARNt. Un grand nombre d'analogues sont donnés dans Sprinzl *et al.* (1998) "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes". *Nucleic Acids Res.*, **26**, 148–153 et sur la base de données "RNA modification database" (<http://medstat.med.utah.edu/RNAmods/>). Les analogues de A peuvent être plus particulièrement sélectionnés dans le groupe constitué de la 1-méthyl-A, de l'inosine et de la 2'-O-méthyl-A. Les analogues de C peuvent être plus particulièrement sélectionnés dans le groupe constitué de la 5-méthyl-C et de la 2'-O-méthyl-C. Les analogues de G peuvent être plus particulièrement sélectionnés dans le groupe constitué de la 7-méthyl-G et de la 2'-O-méthyl-G. Les analogues de U peuvent être plus particulièrement sélectionnés dans le groupe constitué de la pseudouridine, de la ribothymidine, de la 2'-O-méthyl-ribothymidine, de la dihydrouridine, de la 4-thiouridine et de la 3-(3-amino-3-carboxypropyl)-uridine.

Dans la formule ci-dessus, qui utilise les conventions bien connues de l'homme du métier de représentation des ARNt, les liaisons covalentes qui relient entre eux les ribonucléotides de la chaîne ribonucléique ne sont pas représentées et les traits entre les ribonucléotides N-N, X-Z et C-G représentent des liaisons faibles, de préférence de type hydrogène. En revanche, les traits reliant R₂ à X et Z et R₁ à N et X représentent des liaisons covalentes.

A titre d'exemple une représentation générale d'un ARNt chimérique selon l'invention est ainsi donnée dans la **Figure 1**.

De manière préférentielle, l'ARNt chimérique défini ci-dessus présente l'une des formules suivantes :



- T représente la ribothymidine,
 - Ψ représente la pseudouridine,
 - m7G représente la 7-méthyl-guanine,
 - V_7 représente la 3-(3-amino-3-carboxypropyl)-uridine,
- 5 - R_3 représente une séquence de 6 à 5 000 ribonucléotides, plus préférentiellement de 6 à 1 000 ribonucléotides, et plus préférentiellement encore de 6 à 300 ribonucléotides.

Les formules (II), (IV) et (VI) représentent un $ARNt^{Lys_3}$ humain modifié. Les formules (III), (V) et (VII) représentent un $ARNt_m^{Met}$ d'*E. coli* modifié. Dans les

10 formules (IV) et (V) la partie ARNt est liée à un aptamère se liant au dextran (sephadex™). Dans les formules (VI) et (VII) la partie ARNt est liée à un aptamère se liant à la streptavidine. Par ailleurs, dans les formules (II), (IV) et (VI) le point entre les ribonucléotides G et U de la tige acceptrice signifie qu'ils sont liés par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogène dans un appariement de type non

15 Watson-Crick, cette notation est bien connue de l'homme du métier.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'ARNt chimérique défini ci-dessus ne comprend pas la tige de l'anticodon essentiellement intacte de l'ARNt dont il provient. Ceci signifie, notamment, que dans l'ARNt chimérique, entre le ribonucléotide qui précède la tige-boucle de l'anticodon dans l'ARNt avant

20 modification et le ribonucléotide qui suit la tige boucle de l'anticodon dans l'ARNt avant modification, la tige de l'anticodon de l'ARNt avant modification n'est plus présente.

Cellule

La cellule dans lequel est produit l'ARNt peut être une cellule de tout type, eucaryote ou procaryote. De préférence, la cellule est une cellule de type bactérien.

25 De manière particulièrement préférée la cellule est de type *Escherichia coli*.

Acide nucléique

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'acide nucléique

30 codant pour l'ARNt chimérique défini ci-dessus est un ADN. De préférence, cet ADN est compris dans un vecteur d'expression comprenant un promoteur et un terminateur liés de manière opérationnelle à l'acide nucléique, ainsi qu'une origine de réplication et un marqueur de sélection.

De préférence, l'acide nucléique défini ci-dessus est introduit dans la cellule au sein de laquelle il exprime un ARNt chimérique tel que défini ci-dessus. Les moyens d'introduction et d'expression d'un acide nucléique dans une cellule sont bien connus de l'homme du métier.

5 La présente invention concerne également un ARNt chimérique tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également un acide nucléique codant pour un ARNt chimérique tel que défini ci-dessus.

10 La présente invention concerne également un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini ci-dessus, un promoteur et un terminateur, liés de manière opérationnelle à l'acide nucléique, ainsi qu'une origine de réplication et un marqueur de sélection.

La présente invention concerne également une cellule comprenant un acide nucléique tel que défini ci-dessus ou un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus.

15 De préférence, la cellule est une bactérie, notamment du type *E. coli*.

La présente invention concerne également un deuxième acide nucléique, adapté à la préparation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, comprenant, dans le sens 5'-3', au moins :

(i) une séquence codant pour une partie d'un ARNt s'étendant de l'extrémité 5' dudit
20 ARNt au ribonucléotide précédant le premier ribonucléotide de la tige de l'anticodon ou à un ribonucléotide de la tige ou de la boucle de l'anticodon ;

(ii) éventuellement une séquence codant pour tout ou partie d'une étiquette de purification ;

(iii) au moins un site de coupure d'une enzyme de restriction ;

25 (iv) éventuellement une séquence codant pour tout ou partie d'une étiquette de purification ;

(v) une séquence codant pour une partie de l'ARNt s'étendant d'un ribonucléotide de la tige ou de la boucle de l'anticodon en aval du ribonucléotide de (i) ou du ribonucléotide suivant le dernier ribonucléotide de la tige de l'anticodon à l'extrémité
30 3' dudit ARNt.

sous réserve que la séquence du deuxième acide nucléique dans son ensemble ne soit pas la séquence codante de l'ARNt.

De préférence, dans le deuxième acide nucléique tel que défini ci-dessus, adapté à la préparation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, la séquence

définie en (i) s'étend de l'extrémité 5' dudit ARNt au deuxième ribonucléotide de la tige de l'anticodon et la séquence définie en (ii) s'étend de l'avant dernier ribonucléotide de la tige de l'anticodon à l'extrémité 3' dudit ARNt.

De préférence, la séquence du deuxième acide nucléique tel que défini ci-dessus, adapté à la préparation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, est choisie parmi le groupe constitué de :

- SEQ ID NO : 1 ;
- SEQ ID NO : 2 ;
- SEQ ID NO : 3 ;
- 10 - SEQ ID NO : 4 ;
- SEQ ID NO : 5 ;
- SEQ ID NO : 6.

SEQ ID NO : 1 est adapté à la préparation d'un ARNt chimérique de formule (II).

SEQ ID NO : 2 est adapté à la préparation d'un ARNt chimérique de formule (III).

15 SEQ ID NO : 3 est adapté à la préparation d'un ARNt chimérique de formule (IV)

SEQ ID NO : 4 est adapté à la préparation d'un ARNt chimérique de formule (V)

SEQ ID NO : 5 est adapté à la préparation d'un ARNt chimérique de formule (VI)

SEQ ID NO : 6 est adapté à la préparation d'un ARNt chimérique de formule (VII)

La présente invention concerne également un vecteur d'expression
20 comprenant un deuxième acide nucléique tel que défini ci-dessus, adapté à la préparation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, un promoteur et un terminateur, liés de manière opérationnelle à l'acide nucléique, ainsi qu'une origine de répllication et un marqueur de sélection. La séquence de ce vecteur d'expression est de préférence choisie parmi le groupe constitué de :

- 25 - SEQ ID NO : 7 ;
- SEQ ID NO : 8 ;
- SEQ ID NO : 9 ;
- SEQ ID NO : 10 ;
- SEQ ID NO : 11 ;
- 30 - SEQ ID NO : 12.

SEQ ID NO : 7 à 12 comprennent respectivement SEQ ID NO : 1 à 6.

De préférence, dans les vecteurs ci-dessus, le promoteur est choisi dans le groupe constitué des promoteurs *lpp*, *lac*, *tac* et *trc* et *ara* d'*E. coli*, du promoteur pL du bactériophage lambda ou du promoteur du bactériophage T7.

De préférence, dans les vecteurs ci-dessus, le terminateur est un terminateur d'opérons d'ARN ribosomiques, notamment choisi dans le groupe constitué de *rmA*, de *rmB* et de *rmC*.

5 De préférence, dans les vecteurs ci-dessus, le marqueur de sélection est un gène de résistance à un antibiotique, notamment choisi dans le groupe constitué d'un gène de résistance à l'ampicilline, à la kanamycine ou au chloramphénicol.

La présente invention concerne également un procédé de production d'un ARN dans lequel :

- 10 - on cultive des cellules transformées par un acide nucléique tel que défini ci-dessus ;
- on récupère l'ARNt chimérique à partir des cellules cultivées ou du surnageant de culture des cellules cultivées,
- éventuellement on clive l'ARNt chimérique pour récupérer l'ARN à produire sous forme isolée.

15 La présente invention concerne également un kit destiné à la production d'un ARN à l'aide d'un ARNt chimérique le comprenant, lequel kit comprend au moins :

- un vecteur d'expression comprenant un deuxième acide nucléique tel que défini ;
- un moyen de clivage d'un ARNt chimérique permettant de libérer l'ARN à produire ;
- 20 - éventuellement au moins une enzyme de restriction coupant au niveau du site de restriction défini ci-dessus ;
- éventuellement des cellules aptes à être transformées par un acide nucléique et à produire un ARNt chimérique.

Le kit ci-dessus peut également contenir un ligand de purification se liant à l'étiquette de purification comprise le cas échéant dans l'ARNt chimérique.

25 Dans un mode de réalisation particulier du kit défini ci-dessus, le vecteur d'expression est un plasmide bactérien et les cellules sont des bactéries.

Dans un autre mode de réalisation particulier du kit tel que défini ci-dessus, le moyen de clivage est constitué de RNase H et de deux oligonucléotides complémentaires respectivement à une partie de la séquence de l'ARNt chimérique précédant l'extrémité 5' de l'ARN à produire et à une partie de la séquence de l'ARNt chimérique suivant l'extrémité 3' de l'ARN à produire.

30

Avantageusement, la RNase dégrade les hybrides oligonucléotide-ARN, ce qui libère l'ARN.

Dans un mode de réalisation préféré du kit tel que défini ci-dessus :

- les bactéries sont de type *Escherichia coli* ;
- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 7 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14, ou
- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 8 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16, ou
- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 9 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14, ou
- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 10 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16, ou
- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 11 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14, ou
- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 12 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ARNt chimérique tel que défini ci-dessus, pour résoudre la structure tridimensionnelle de l'ARN inséré ou substitué, en appliquant la technique de la résonance magnétique nucléaire à une solution de l'ARNt chimérique ou en appliquant la technique de la diffraction aux rayons X à des cristaux de l'ARNt chimérique.

En effet, avantageusement, la structure de l'ARN inséré ou substitué est conservée dans l'ARNt chimérique par rapport à l'ARN sous forme isolée. De plus, dans le cadre de la cristallographie, la présence de la partie ARNt peut favoriser la cristallisation de l'ARNt chimérique dans son ensemble. En outre, si un ARNt de structure cristallographique connue est utilisé pour la production de l'ARNt chimérique, alors les données de structure cristallographique de l'ARNt peuvent être utilisées pour la résolution de la structure cristallographique de l'ARNt chimérique dans son ensemble, notamment lors de l'étape de phasage ou de remplacement moléculaire.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ARNt chimérique tel que défini ci-dessus, en tant qu'ARN antisens, ARN interférent, aptamère, ou ribozyme, lorsque l'ARN inséré ou substitué est respectivement un ARN antisens, un ARN interférent, un aptamère, ou un ribozyme.

En effet, avantageusement et le cas échéant, les ARNt chimérique de l'invention sont tels que l'activité de l'ARN inséré ou substitué est conservée par rapport à l'ARN sous forme isolée.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ARNt chimérique tel que défini ci-dessus à titre de substance active, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

En outre, les ARNt chimériques selon l'invention peuvent être utilisés pour la réalisation de chimiothèques d'ARN, notamment à l'aide de molécules d'ARN obtenues de manière combinatoire. Ces chimiothèques d'ARN peuvent être utilisées afin de cribler des cibles pharmacologiques potentielles. *A contrario*, on peut cribler des ARNt chimériques selon l'invention, notamment lorsqu'ils expriment des ARN qui sont des cibles pharmacologiques potentielles, comme des ARN ribosomiques bactériens ou des ARN viraux, à l'aide de candidats médicaments.

Enfin, l'expression des ARNt chimériques au sein de cellules permet d'envisager des co-purification avec des partenaires des ARN, comme par exemple une purification directe de complexes ribonucléoprotéiques, ce qui permettrait notamment l'identification des partenaires, protéiques ou autres, d'un ARN donné.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide des exemples suivants qui n'ont aucune valeur limitative.

DESCRIPTION DES FIGURES

20 **Figure 1**

La figure 1 représente la structure d'un ARNt chimérique selon l'invention. La partie conservée de l'ARNt est nommée chassis ARNt. Les nucléotides indiqués entre parenthèses sont optionnels. Les nucléotides indiqués en gras et grisé correspondent aux positions conservées ou semi-conservées.

25

Figure 2

La figure 2 représente la structure d'un ARNt^{Lys}₃ chimérique incorporant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B humaine.

30 **Figure 3**

La figure 3 représente la structure d'un ARNt^{Lys}₃ chimérique incorporant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B humaine (à gauche) et le spectre HSQC correspondant (à droite). Le spectre enregistré à 15°C sur un spectromètre 600 MHz Bruker Avance. L'ARN chimérique a été dialysé contre de l'eau distillée, puis

lyophilisé et enfin solubilisé dans un mélange 90% H₂O/10% D₂O à la concentration de 1 mmol/L (volume total environ 400 µL). La région spectrale montrée correspond aux déplacements (axes verticaux et horizontaux, ppm) des groupements NH imino impliqués dans les appariements de bases. A chaque appariement A-U ou G-C dans l'ARN correspond un pic donné. Ce spectre est une "signature" de la structure 2D et 3D de l'ARN étudié. On y retrouve les pics correspondant au chassis ARNt, d'une part, et à l'ARN epsilon, d'autre part, ce qui montre que, dans l'ARN chimérique, chacune des deux parties constituantes conserve sa structure propre. La numérotation des ribonucléotides dans le spectre HSQC correspond à celle donnée pour l'ARNt chimérique représenté.

Figure 4

La figure 4 représente des photographies de cristaux d'un ARNt^{Lys}₃ chimérique incorporant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B humaine – Cristaux obtenus par diffusion de vapeur en goutte assise, au moyen du kit Natrix[®] (Hampton Research) sur un robot de cristallisation CyBio HTPC. La goutte représente un volume total de 1 µL.

Figure 5

La figure 5 représente le résultat de la digestion à la RNase H d'un ARNt^{Lys}₃ chimérique incorporant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B humaine. L'ARNt chimérique (environ 50 µg) est hybridé à deux oligonucléotides ADN complémentaires des régions en 5' et 3' de l'ARN epsilon dans un rapport 1:1:1, puis incubé à 37°C en présence de RNase H d'*E. coli* (10 unités/nmol ADN) dans un tampon 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Des aliquots sont prélevés à divers temps d'incubation, puis analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-urée 16% en conditions dénaturantes. La présence d'ARN est révélée par ombrage aux ultraviolets (UV). Piste de gauche : ARNt chimérique non traité. Piste de droite : marqueur. Au centre, de gauche à droite : points de la cinétique de coupure après 1h, 2h et 3h d'incubation respectivement.

Figure 6

La figure 6 représente le résultat d'une expérience de dimérisation d'un ARNt chimérique incorporant le domaine de dimérisation de l'ARN génomique viral du VIH.

L'ARNt chimérique a été incubé en présence de 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, puis déposé sur un gel d'acrylamide 8% non dénaturant (conditions natives). La migration est effectuée à 4°C pour éviter la fusion des appariements de bases. La présence des espèces d'ARN est révélée par ombrage UV. Piste de gauche : ARNt chimérique contrôle. Piste de droite : ARNt chimérique portant la séquence de dimérisation du VIH. Les deux ARN insérés dans les ARNt chimériques ayant la même taille (environ 110 ribonucléotides), la différence de migration en conditions natives traduit la formation du dimère d'ARN, via les séquences de l'ARN viral.

10

Figure 7

La figure 7 représente le spectre d'absorption du vert de malachite en absence et en présence d'un ARNt chimérique incorporant un aptamère de liaison au vert de malachite. Le graphe représente l'absorption (axe des ordonnées, unités arbitraires) en fonction de la longueur d'onde (axe des abscisses, en nm). Les spectres sont ceux de solutions aqueuses de vert de malachite à la même concentration (environ 100 nmol/L), en présence ou en absence d'ARNt chimérique. En présence d'ARNt chimérique portant l'aptamère spécifique du colorant, on observe une exaltation importante de l'absorption et un décalage vers le rouge du maximum. Ce déplacement n'est pas observé avec un ARNt chimérique contrôle. Ce phénomène est analogue à celui observé pour l'aptamère seul (sans chassis ARNt) et montre que son inclusion au sein de l'ARNt chimérique n'affecte pas ses propriétés fonctionnelles.

Figure 8

La figure 8 représente le résultat d'une expérience de détermination de la constante de dissociation (K_d) entre un ARNt chimérique incorporant un aptamère de liaison au vert de malachite et le vert de malachite. La courbe montre le signal de fluorescence (axe des ordonnées, unité arbitraires) émis par le colorant en fonction de la concentration d'ARNt chimérique ajouté dans la cuve du spectrophotofluorimètre (axe des abscisses, $\times 10^{-7}$ mol/L) (longueur d'onde d'excitation = 610 nm, longueur d'onde d'émission = 645 nm). Le K_d est déterminé par ajustement non-linéaire itératif de la courbe théorique aux valeurs expérimentales mesurées.

30

Figure 9

La figure 9 représente la structure d'ARNt^{Lys}₃ humains chimériques incorporant des aptamères de liaison au dextran (sephadex™) (A) et à la streptavidine (B) et d'ARNt_m^{Met} chimériques incorporant des aptamères de liaison au dextran (sephadex™) (C) et à la streptavidine (D).

Figure 10

La figure 10 représente le profil électrophorétique des étapes de purification d'un ARNt^{Lys}₃ chimérique incorporant un aptamère de liaison au sephadex™. Les billes de sephadex™ ont tout d'abord été équilibrées dans un tampon A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM), mises en présence des ARN cellulaires totaux obtenus par extraction phénolique, puis le tout a été agité pendant 30 min. à 4°C. Les billes ont été lavées trois fois à l'aide du tampon A puis les ARN comprenant un aptamère de liaison au sephadex™ ont été élués à l'aide de dextran soluble. Les différentes fractions ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel acrylamide-urée. De gauche à droite : ARN totaux, ARN non retenus sur les billes, lavages 1, 2 et 3, ARN retenus sur les billes (avant élution), ARN élués par du dextran soluble.

Figure 11

La figure 11 représente la structure d'un ARNt^{Lys}₃ humains chimériques incorporant un aptamère de liaison à la streptavidine et au domaine epsilon du VHB humain.

EXEMPLES

Exemple 1

5 **Production d'un ARNt chimérique comprenant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B**

L'ARNt^{Lys}₃ humain a été modifié pour incorporer le domaine epsilon du virus de l'hépatite B (**Figure 2**).

10 Brièvement, un vecteur d'expression pBSTNav-Lys comprenant la séquence codante de l'ARNt^{Lys}₃ humain modifiée par insertion des sites de restriction *EagI*, *EcoRV* et *SacII* a été préparé (SEQ ID NO : 7), puis la séquence du domaine epsilon du virus de l'hépatite B humaine (SEQ ID NO : 17) a été insérée entre les sites *EagI* et *SacII* pour donner le vecteur pBSTNav-Lys-epsilon.

15 Ce vecteur a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli*. Celles-ci ont ensuite été mises en culture dans un milieu riche (Luria-Broth, LB) en présence d'ampicilline à la concentration de 100 µg/ml, pendant 14-15 heures à 37°C. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation (30 min. à 4000 tpm pour 1 litre de culture). Le culot a été solubilisé dans 8,6 ml d'un tampon 10 mM Mg acétate, 10 mM Tris-HCl pH 7,4. 10 ml de phénol saturé dans ce même tampon ont alors été ajoutés
20 et le tout a été agité doucement pendant 1 h à température ambiante puis centrifugé 30 min. à 10 000 tpm. A la phase aqueuse ont alors été ajoutés 0,1 volume de NaCl 5M et 2 volumes d'éthanol pur. Le tout a été centrifugé 30 min. à 10 000 tpm (4°C) et le culot a été récupéré et solubilisé dans 5 ml de NaCl 1M. Le solubilisé a été centrifugé 30 min à 10 000 tpm (4°C) puis le surnageant a été récupéré. 2,5 volumes
25 d'éthanol ont alors été ajoutés et une nouvelle centrifugation 30 min à 10 000 tpm (4°C) a été effectuée. Le culot a été récupéré et dissous dans de l'eau. A partir d'un litre de culture dans du milieu LB (Luria-Broth) on obtient environ 100 mg d'ARN totaux.

30 Dans certains cas, les ARNt ont ensuite été purifiés sur résine échangeuse d'anion (60 mL de phase, *Q-sepharose*, Pharmacia). La purification s'est effectuée dans le phosphate de sodium pH 6,5 50 mM, avec un gradient allant de 500 mM à 650 mM de NaCl sur 475 mL avec un débit de 0,5 mL/min. L'ARNt chimérique est élué après les ARNt endogènes, plus courts. Après cette étape, à partir d'1 litre de

culture, en fin d'échangeuse d'ion, on obtient environ 50 mg d'ARNt chimérique (ARNt^{Lys}₃ + epsilon) purifié.

L'ARNt^{Lys}₃ chimérique comprenant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B marqué à l'azote ¹⁵N en appliquant la procédure décrite ci-dessus à une culture de bactéries cultivée sur un milieu enrichi (milieu Spectra-9N, Spectra Stable Isotopes, ou équivalent), a été caractérisé par résonance magnétique nucléaire (RMN). Le spectre HSQC (corrélation simple-quantum hétéronucléaire ¹H-¹⁵N) présenté dans la **Figure 3** montre ainsi que le domaine epsilon est structuré conformément à sa conformation naturelle. Ceci démontre que le procédé de production d'ARN selon l'invention permet d'obtenir des ARN correctement structurés et que de surcroît les ARNt chimériques selon l'invention sont utiles pour la résolution de structures RMN de molécules d'ARN sans qu'il soit nécessaire de séparer celles-ci de l'ARNt chimérique.

Par ailleurs, l'ARNt^{Lys}₃ chimérique comprenant le domaine epsilon du virus de l'hépatite B a pu être cristallisé (**Figure 4**). Ceci démontre également l'intérêt du procédé de production d'ARN selon l'invention pour la résolution de structures cristallographiques. Cet intérêt est renforcé par le fait dans le cas où la structure cristallographique de l'ARNt à partir duquel est formé l'ARNt chimérique est connue, il est alors possible d'utiliser cette structure pour l'étape de phasage ou de remplacement moléculaire lors de la résolution de la structure cristallographique de l'ARNt chimérique dans son ensemble.

Enfin, le domaine epsilon du virus de l'hépatite B a été séparé de l'ARNt^{Lys}₃ chimérique par digestion à la RNase H.

Brièvement, deux oligonucléotides (SEQ ID NO : 13 et 14) en solution aqueuse sont mis en présence de l'ARNt^{Lys}₃ chimérique dans un rapport molaire 1:1. Le mélange ainsi obtenu (environ 100 µL) est porté à 95°C en bain marie, puis après refroidissement à température ambiante on ajoute un tampon de façon à obtenir en concentration finale 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 et de la RNase H d'*E. coli* (10 U / nmol ADN) que l'on laisse agir à 37°C pendant 4 heures. Le résultat de la digestion est présenté dans la **Figure 5**.

De la même manière que ci-dessus, un vecteur d'expression pBSTNav-Met comprenant la séquence codante de l'ARNt_m^{Met} d'*Escherichia coli* modifiée par

insertion des sites de restriction *EagI*, *EcoRV* et *SacII* a été préparé (SEQ ID NO : 8), puis la séquence du domaine epsilon du virus de l'hépatite B (SEQ ID NO : 17) a été insérée entre les sites *EagI* et *SacII* pour donner le vecteur pBSTNav-Met-epsilon.

5 **Exemple 2**

Production d'un ARNt chimérique comprenant le site de dimérisation génomique du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Le site de dimérisation génomique du VIH a été inséré au sein de l'ARNt^{Lys₃} humain ou de l'ARNt^{Met} d'*Escherichia coli*, comme cela a été décrit dans l'**Exemple 1**, respectivement par insertion d'un ADN codant le site de dimérisation (SEQ ID NO : 18) dans les vecteurs d'expression pBSTNav-Lys (SEQ ID NO : 7) et pBSTNav-Met (SEQ ID NO : 8) après coupure par les enzymes de restriction *EagI* et *SacII*. Le procédé de production de l'ARNt chimérique correspondant et les rendements sont analogues à ceux de l'**Exemple 1**.

La fonctionnalité du site de dimérisation de l'ARN génomique du VIH au sein du châssis formé par l'ARNt a été contrôlée par électrophorèse en gel natif 8% acrylamide en absence d'urée, à 4°C (**Figure 6**). Dans ces conditions, on observe la migration d'une espèce correspondant au double de la taille attendue pour l'ARNt chimérique, ce qui démontre la formation du dimère et donc le caractère fonctionnel de la séquence d'ARN viral insérée dans le châssis ARNt

Exemple 3

Production d'un ARNt chimérique comprenant un aptamère de liaison au vert malachite

Un aptamère de liaison au vert de malachite a été inséré au sein de l'ARNt^{Lys₃} humain, comme cela a été décrit dans l'**Exemple 1**, par insertion d'un ADN codant l'aptamère (SEQ ID NO : 19) dans le vecteur d'expression pBSTNav-Lys (SEQ ID NO : 7) après coupure par les enzymes de restriction *EagI* et *SacII*. Le procédé de production de l'ARNt chimérique correspondant et les rendements sont analogues à ceux de l'**Exemple 1**.

La fonctionnalité de l'aptamère a été contrôlée en vérifiant que l'ARNt chimérique était bien capable de lier le vert de malachite – la liaison du colorant à

l'aptamère se traduisant par une augmentation de son coefficient d'extinction molaire (**Figure 7**). La constante de dissociation de l'ARNt chimérique selon l'invention pour le vert malachite a été estimée à $50 \cdot 10^{-9}$ mol/L (**Figure 8**), ce qui est semblable à la valeur mesurée pour l'aptamère seul. Avantageusement, les ARNt chimériques
 5 comprenant un aptamère selon l'invention peuvent donc être utilisés directement comme aptamère, sans qu'il soit nécessaire de cliver le châssis ARNt.

Exemple 4

Production d'un ARNt chimérique comprenant une portion de l'ARNr 16S d'*E. coli*
 10 *coli*

Une partie de l'ARNr 16S d'*E. coli* a été insérée au sein de l'ARNt^{Lys}₃ humain comme cela a été décrit dans l'**Exemple 1**, par insertion d'un ADN codant la portion d'ARNr (SEQ ID NO : 20) dans le vecteur d'expression pBSTNav-Lys (SEQ ID NO :
 15 7) après coupure par les enzymes de restriction *EagI* et *SacII*.

Cet ARNt chimérique est utile, par exemple pour cribler des composés antibiotiques agissant sur cette région du ribosome bactérien, comme par exemple les aminoglycosides et leur analogues.

Exemple 5

Production d'un ARNt chimérique comprenant un aptamère de liaison à la streptavidine ou au sephadex™

Un aptamère de liaison à la streptavidine a été inséré au sein de l'ARNt^{Lys}₃ humain ou de l'ARNt^{Met}_m d'*Escherichia coli*, comme cela a été décrit dans l'**Exemple**
 25 **1**, respectivement par insertion d'un ADN codant l'aptamère (SEQ ID NO : 21) dans le vecteur d'expression pBSTNav-Lys (SEQ ID NO : 7) et pBSTNav-Met (SEQ ID NO : 8) après coupure par les enzymes de restriction *EagI* et *SacII*, pour donner pBSTNav-Lys-strepta et pBSTNav-Met-strepta (voir **Figure 9**).

30 De même, un aptamère de liaison au sephadex™ (billes de dérivé de dextran commercialisées par Pharmacia) a été inséré au sein de l'ARNt^{Lys}₃ humain ou de l'ARNt^{Met}_m d'*Escherichia coli*, comme cela a été décrit dans l'**Exemple 1**, respectivement par insertion d'un ADN codant l'aptamère (SEQ ID NO : 22) dans le vecteur d'expression pBSTNav-Lys (SEQ ID NO : 7) et pBSTNav-Met (SEQ ID NO :

8) après coupure par les enzymes de restriction *EagI* et *SacII*, pour donner pBSTNav-Lys-sepha et pBSTNav-Met-sepha (voir **Figure 9**).

5 La fonctionnalité de l'ARN^{Lys}₃ comprenant un aptamère de liaison au sephadex™ est présentée à titre d'exemple. Pour ceci, une solution d'ARN obtenue après extraction au phénol comme cela est présenté dans l'**Exemple 1**, a été directement purifiée à l'aide de billes de sephadex™.

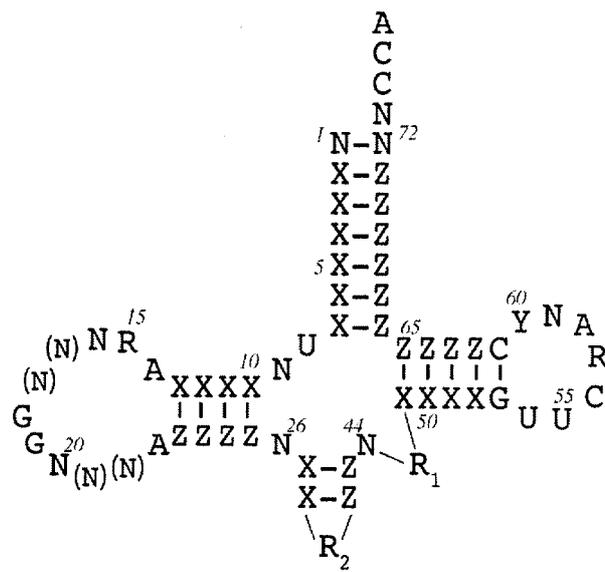
10 Brièvement, les billes de sephadex™ ont tout d'abord été équilibrées dans un tampon A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM), mise en présence des ARN, puis le tout a été agité pendant 30 min. à 4°C. Les billes ont été lavées trois fois à l'aide du tampon A puis les ARN comprenant un aptamère de liaison au sephadex™ ont été élués à l'aide de dextran soluble (Sigma-Aldrich). Les résultats de cette purification sont présentés **Figure 10**.

15 Par ailleurs, deux sites de restriction *Sall* et *AatII* ont été insérés dans la partie correspondant à la séquence codant l'aptamère ce qui permet de fournir un système complet de production et de purification d'ARN constitué des vecteurs pBSTNav-Lys-sepha, pBSTNav-Met-sepha, pBSTNav-Lys-strepta et pBSTNav-Met-strepta (SEQ ID NO : 9 à 12).

20 Plusieurs ARN ont ainsi été exprimés à l'aide de ce système, notamment le domaine epsilon du virus de l'hépatite B (VHB) humain (SEQ ID NO : 23) (**Figure 11**), le domaine epsilon du HBV de canard (SEQ ID NO : 24), et le domaine d'interaction de l'ARN ribosomique 23S avec la protéine ribosomique L20 (SEQ ID NO : 25), ce dernier ARN étant notamment utile pour le criblage d'antibiotiques
25 dirigés contre le ribosome bactérien.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'un acide nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique, lequel ARNt chimérique provient de la modification d'un ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de la tige boucle de l'anticodon dudit l'ARNt par un ARN, pour la production *ex vivo* dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans une cellule.
2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'ARN substitue tout ou une partie de la tige-boucle de l'anticodon comprise entre le premier ribonucléotide, inclus, de la tige-boucle de l'anticodon et le dernier ribonucléotide, inclus, de la tige-boucle de l'anticodon.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle l'ARNt chimérique présente la formule (I) suivante:

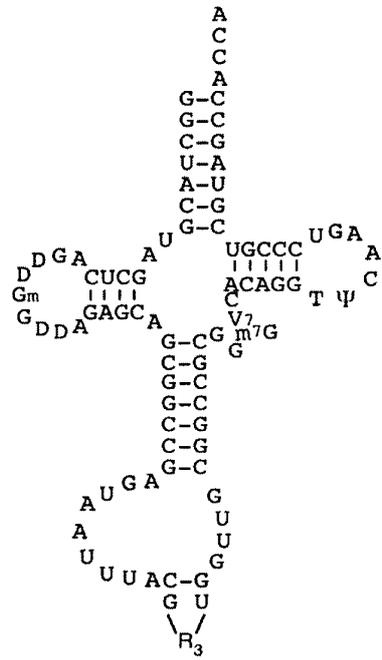
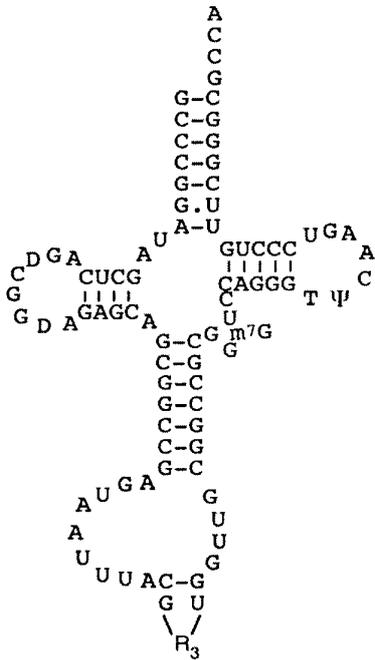
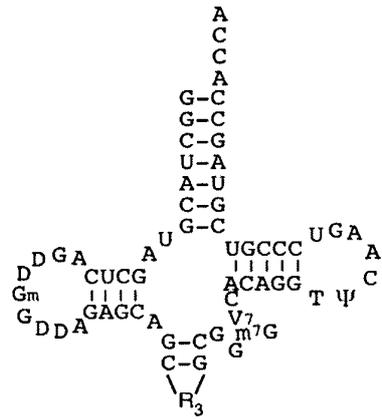
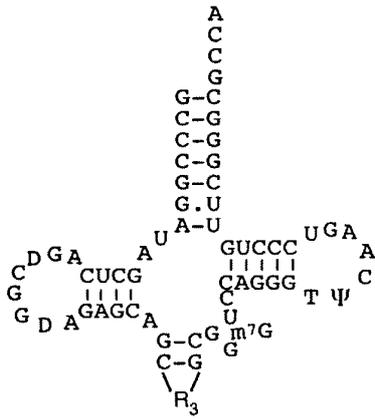


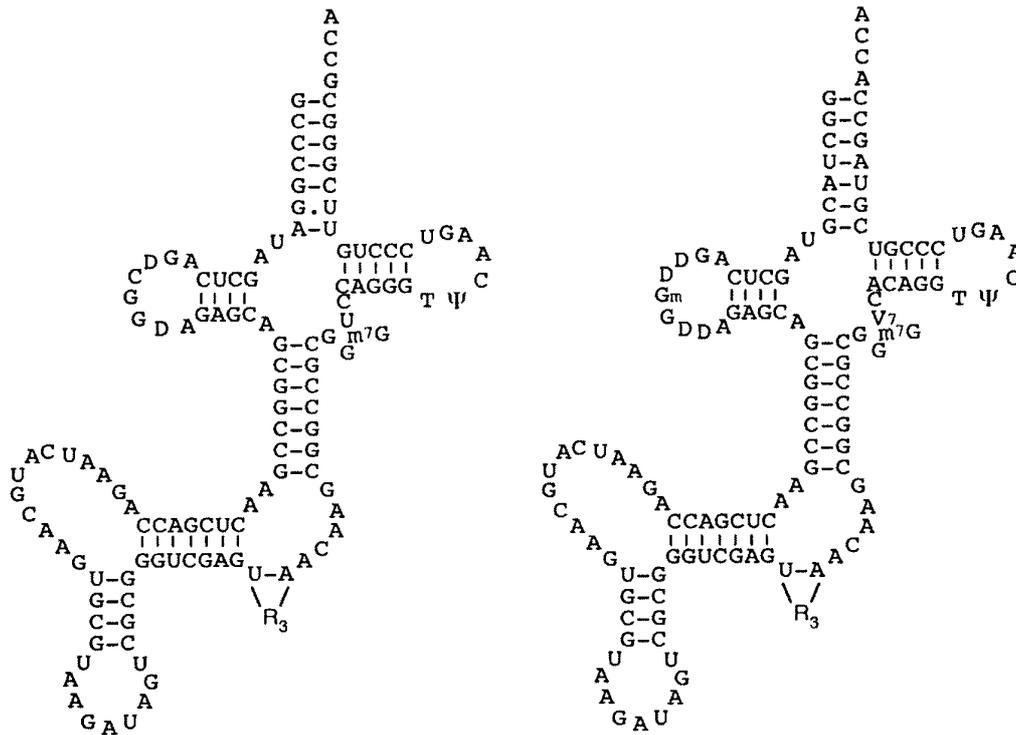
(I)

dans laquelle :

- A représente l'adénine ou un de ses analogues, C représente la cytosine ou un des ses analogues, G représente la guanosine ou un de ses analogues et U représente l'uridine ou un de ses analogues,
- chacun des N, identiques ou différents, représente un ribonucléotide quelconque,
- chacun des (N), identiques ou différents, représente un ribonucléotide quelconque, qui peut être présent ou absent,

- R représente A ou G, ou leurs analogues,
 - Y représente U ou C, ou leurs analogues
 - chacun des X-Z, identiques ou différents, représente une paire A-U, U-A, G-C, C-G, G-U ou U-G, ou leurs analogues,
- 5 - les ribonucléotides N en position 1 et N en position 72 peuvent être appariés ou non,
- R₁ représente une séquence de 3 à 20 ribonucléotides,
 - R₂ représente l'ARN inséré, à savoir une séquence de 6 à 300 ribonucléotides.
- 10 **4.** Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle l'ARNt est sélectionné parmi le groupe constitué des ARNt d'archée, de bactérie, de virus, de protozoaire, de champignon, d'algue, de plante ou d'animal.
- 5.** Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, dans laquelle tout ou partie de
- 15 l'ARN est choisi dans la liste constituée d'un ARN antisens, d'un ARN interférent, d'un aptamère, d'un ribozyme, d'un ARN viral, d'un ARN ribosomique, et d'un ARN nucléolaire.
- 6.** Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle l'ARN est structuré.
- 20 **7.** Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle l'ARN comprend une étiquette de purification.
- 8.** Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle l'étiquette de purification est
- 25 choisie dans le groupe constitué d'un ribozyme ou d'un aptamère.
- 9.** Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle l'ARNt chimérique présente l'une des formules suivantes :





dans lesquelles :

- D représente la dihydrouridine,
 - 5 - T représente la ribothymidine,
 - Ψ représente la pseudouridine,
 - m^7G représente la 7-méthyl-guanine,
 - V_7 représente la 3-(3-amino-3-carboxypropyl)-uridine,
 - R_3 représente une séquence de 6 à 300 ribonucléotides.
- 10

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, dans laquelle l'acide nucléique est compris dans un vecteur d'expression comprenant un promoteur et un terminateur liés de manière opérationnelle à l'acide nucléique, ainsi qu'une origine de réplication et un marqueur de sélection.

15

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle l'ARNt chimérique ne comprend pas la tige de l'anticodon substantiellement intacte de l'ARNt dont il provient.

20

12. ARNt chimérique tel que défini dans la revendication 11.

13. Acide nucléique codant pour un ARNt chimérique tel que défini dans la revendication 12.

14. Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini dans la revendication 13, un promoteur et un terminateur, liés de manière opérationnelle à l'acide nucléique, ainsi qu'une origine de réplication et un marqueur de sélection.

15. Cellule comprenant un acide nucléique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11 et 13 ou un vecteur d'expression tel que défini dans l'une des revendications 10 et 14.

16. Acide nucléique adapté à la préparation d'un acide nucléique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11 et 13, comprenant, dans le sens 5'-3', au moins :

(i) une séquence codant pour une partie d'un ARNt s'étendant de l'extrémité 5' dudit ARNt au ribonucléotide précédant le premier ribonucléotide de la tige de l'anticodon ou à un ribonucléotide de la tige ou de la boucle de l'anticodon ;

(ii) éventuellement une séquence codant pour tout ou partie d'une étiquette de purification ;

(iii) au moins un site de coupure d'une enzyme de restriction ;

(iv) éventuellement une séquence codant pour tout ou partie d'une étiquette de purification ;

(v) une séquence codant pour une partie de l'ARNt s'étendant d'un ribonucléotide de la tige ou de la boucle de l'anticodon en aval du ribonucléotide de (i) ou du ribonucléotide suivant le dernier ribonucléotide de la tige de l'anticodon à l'extrémité 3' dudit ARNt.

sous réserve que la séquence du deuxième acide nucléique dans son ensemble ne soit pas la séquence codante de l'ARNt.

17. Acide nucléique selon la revendication 16, dont la séquence est choisie parmi le groupe constitué de :

- SEQ ID NO : 1 ;

- SEQ ID NO : 2 ;

- SEQ ID NO : 3 ;

- SEQ ID NO : 4 ;

- SEQ ID NO : 5 ;
- SEQ ID NO : 6.

5 **18.** Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini dans la revendication 16 ou 17, un promoteur et un terminateur, liés de manière opérationnelle à l'acide nucléique, ainsi qu'une origine de réplication et un marqueur de sélection.

10 **19.** Vecteur d'expression selon la revendication 18, dont la séquence est choisie parmi le groupe constitué de :

- SEQ ID NO : 7 ;
- SEQ ID NO : 8 ;
- SEQ ID NO : 9 ;
- SEQ ID NO : 10 ;
- 15 - SEQ ID NO : 11 ;
- SEQ ID NO : 12.

20. Procédé de production d'un ARN dans lequel :

- 20 - on cultive des cellules transformées par un acide nucléique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11 ;
- on récupère l'ARNt chimérique à partir des cellules cultivées ou du surnageant de culture des cellules cultivées,
- éventuellement on clive l'ARNt chimérique pour récupérer l'ARN à produire sous forme isolée.

25

21. Kit destiné à la production d'un ARN à l'aide d'un ARNt chimérique le comprenant, lequel kit comprend au moins :

- un vecteur d'expression tel que défini dans la revendication 18 ou 19 ;
- un moyen de clivage d'un ARNt chimérique permettant de libérer l'ARN à produire ;
- 30 - éventuellement au moins une enzyme de restriction coupant au niveau du site de restriction défini dans la revendication 16 ;
- éventuellement des cellules aptes à être transformées par un acide nucléique et à produire un ARNt chimérique.

22. Kit selon la revendication 21, dans lequel le vecteur d'expression est un plasmide bactérien et les cellules sont des bactéries.

23. Kit selon la revendication 21 ou 22, dans lequel le moyen de clivage est constitué de RNase H et de deux oligonucléotides complémentaires respectivement à une partie de la séquence de l'ARNt chimérique précédant l'extrémité 5' de l'ARN à produire et à une partie de la séquence de l'ARNt chimérique suivant l'extrémité 3' de l'ARN à produire.

24. Kit selon la revendication 23, dans lequel :

- les bactéries sont de type *Escherichia coli* ;

- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 7 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14, ou

- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 8 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16, ou

- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 9 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14, ou

- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 10 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16, ou

- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 11 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14, ou

- le vecteur d'expression est représenté par SEQ ID NO : 12 et les oligonucléotides sont représentés par SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16.

25. Utilisation d'un ARNt chimérique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11, pour résoudre la structure tridimensionnelle de l'ARN inséré ou substitué, en appliquant la technique de la résonance magnétique nucléaire à une solution de l'ARNt chimérique ou en appliquant la technique de la diffraction aux rayons X à des cristaux de l'ARNt chimérique.

30

26. Utilisation *ex vivo* d'un ARNt chimérique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11, en tant qu'ARN antisens, ARN interférent, aptamère, ou ribozyme, lorsque l'ARN inséré ou substitué est respectivement un ARN antisens, un ARN interférent, un aptamère, ou un ribozyme.

27. Composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active au moins un ARNt chimérique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

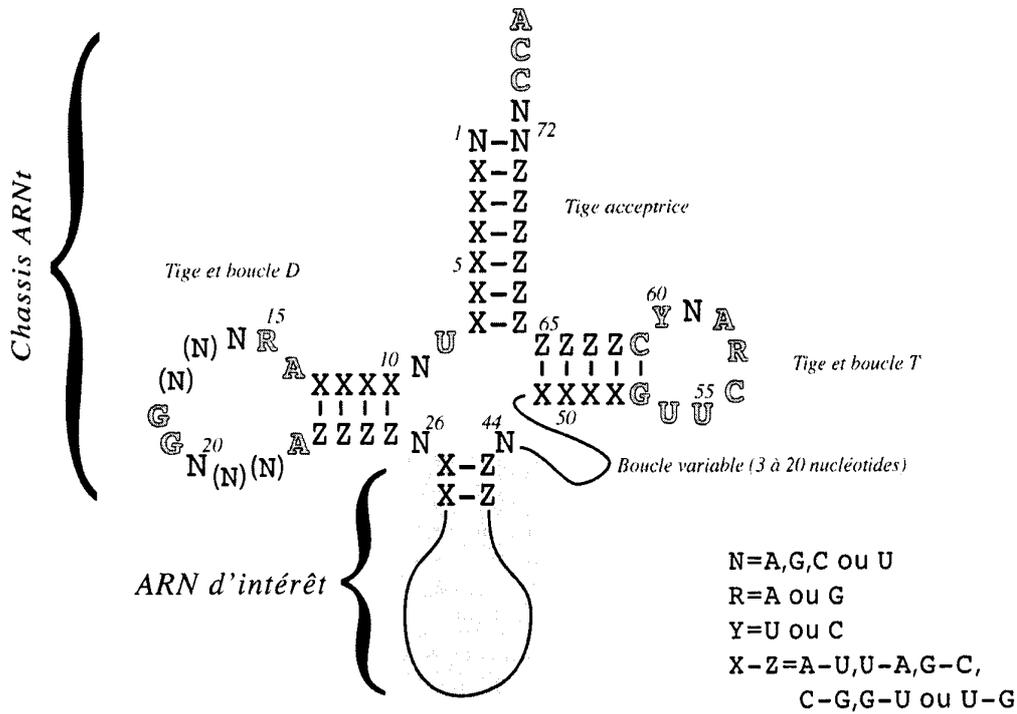


Figure 1

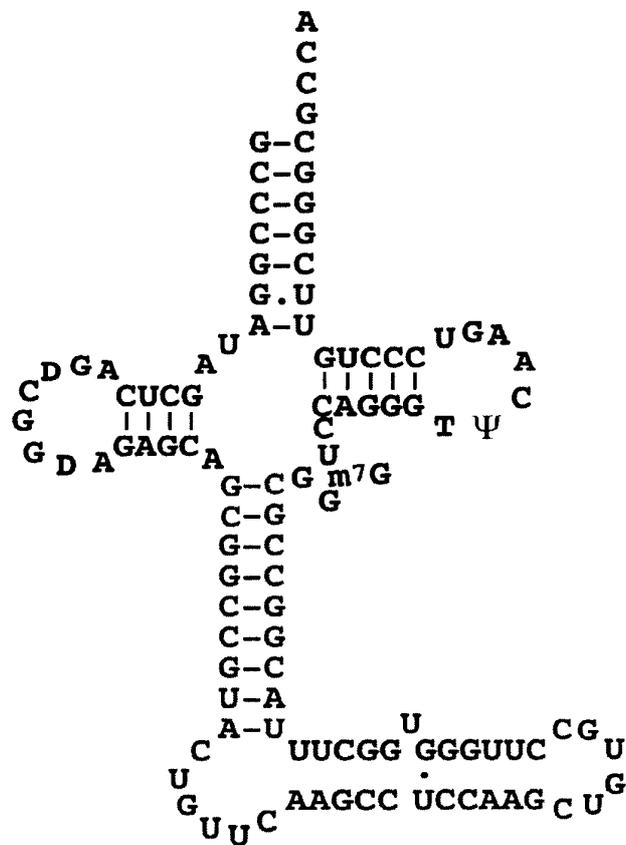


Figure 2

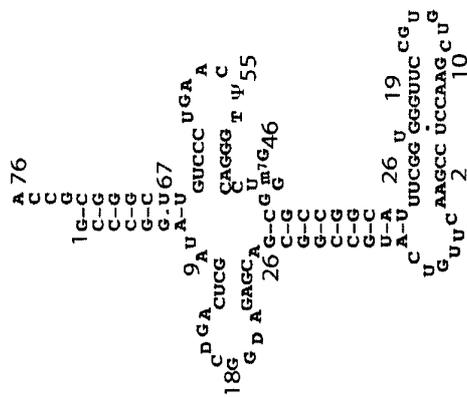
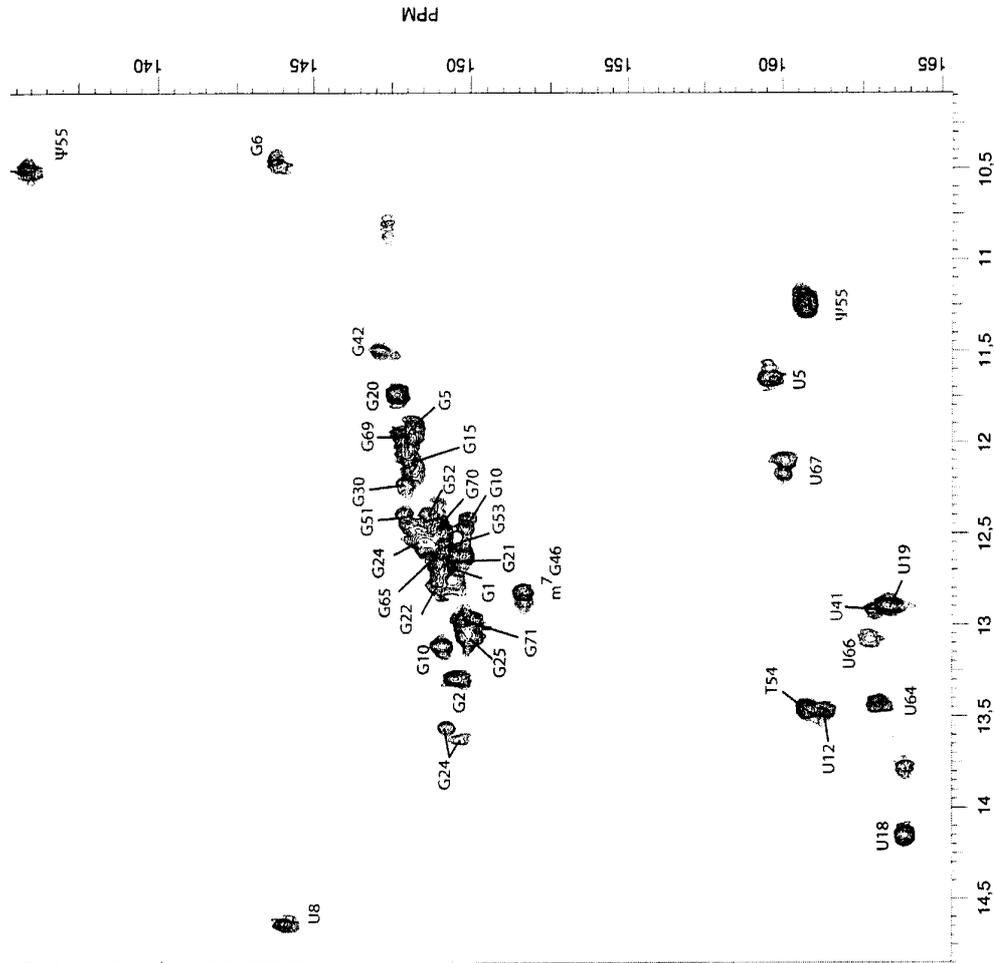


Figure 3

3/7

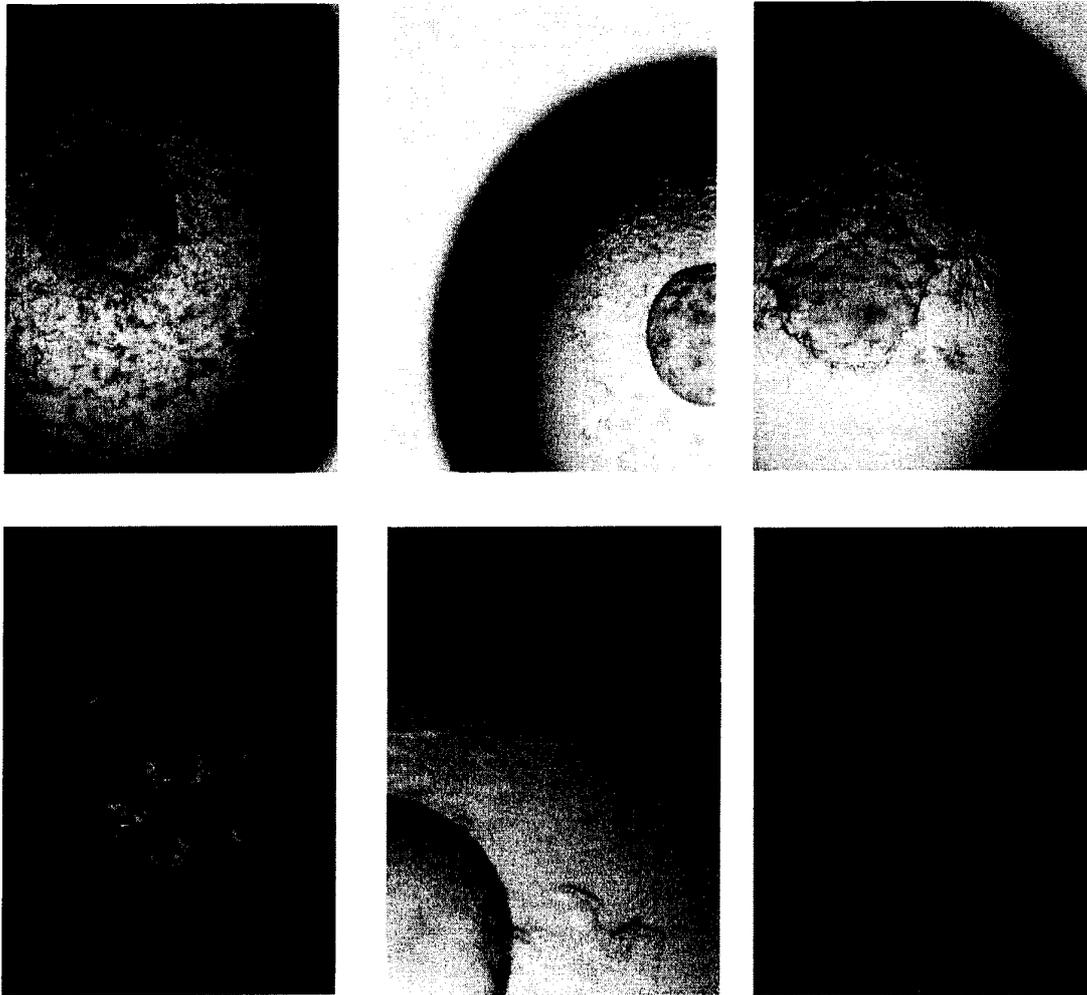


Figure 4

4/7

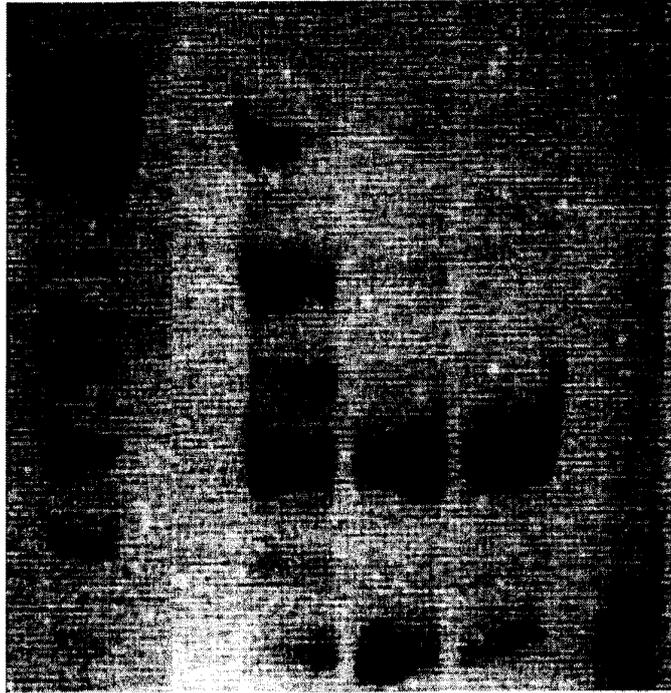


Figure 5



Figure 6

517

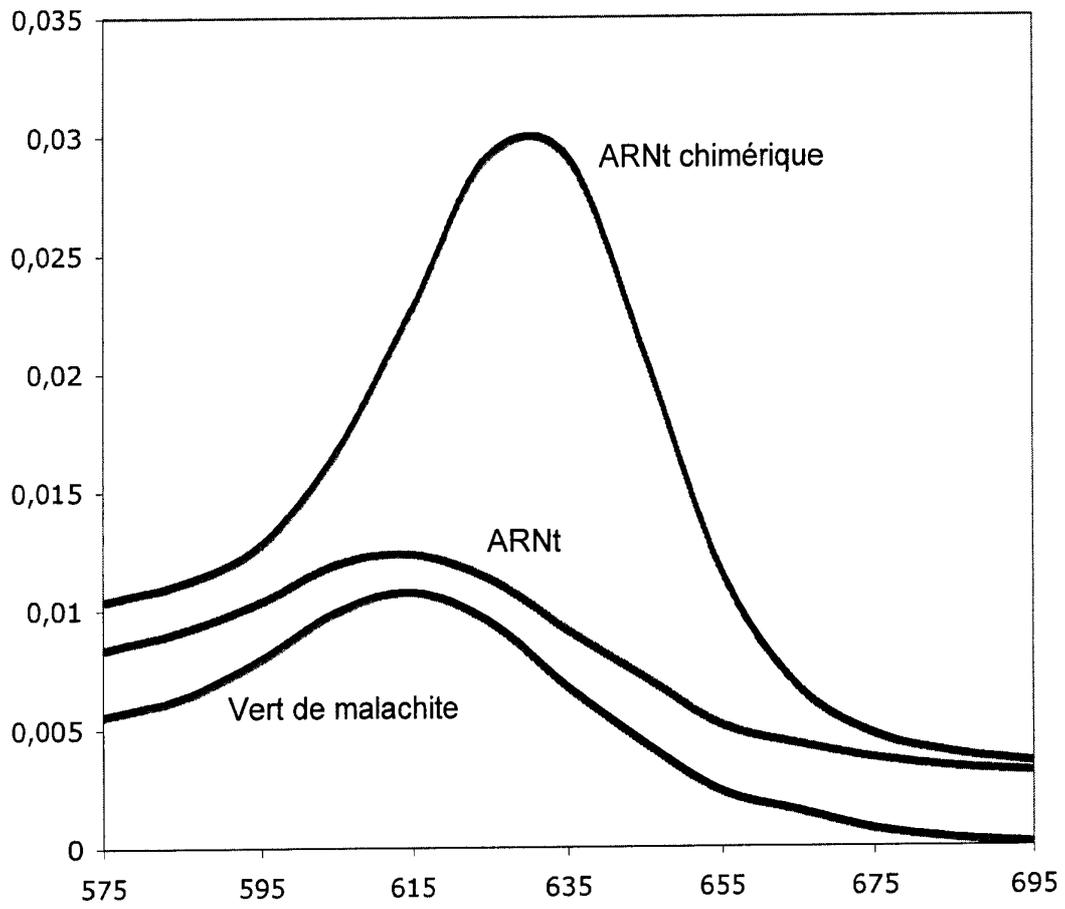


Figure 7

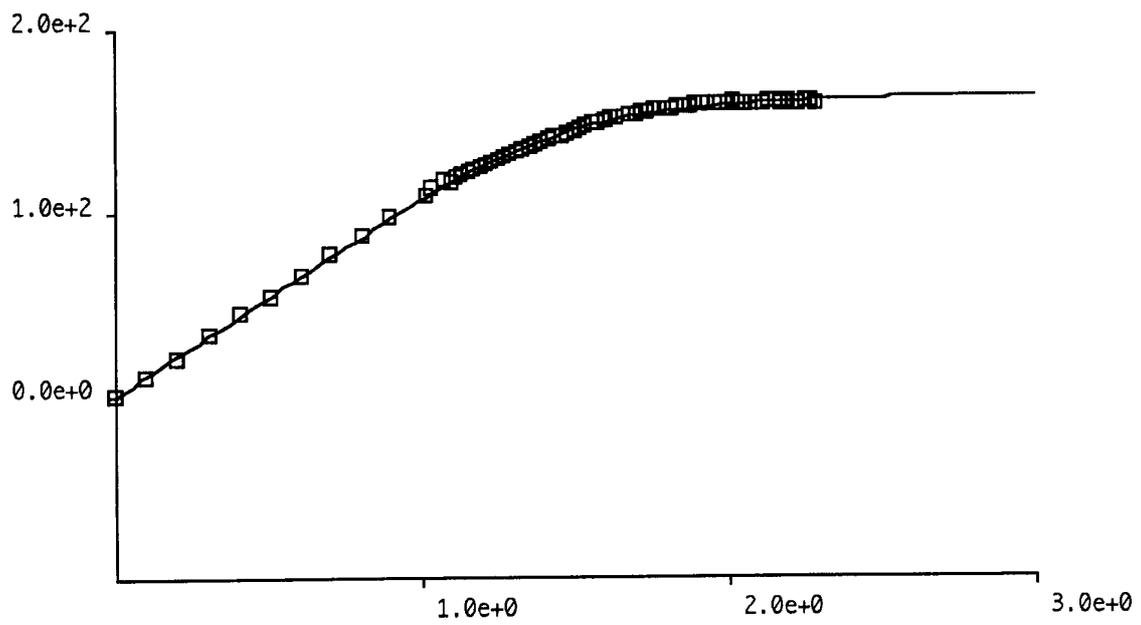
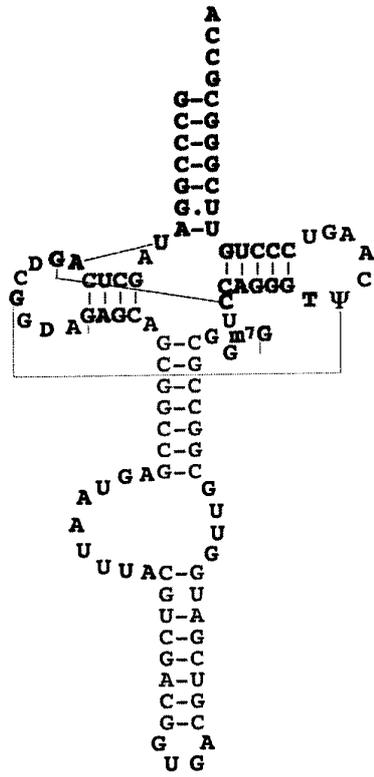
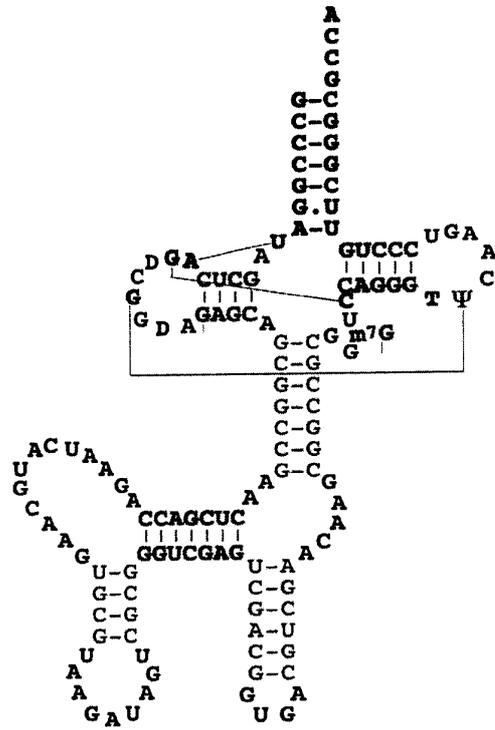


Figure 8

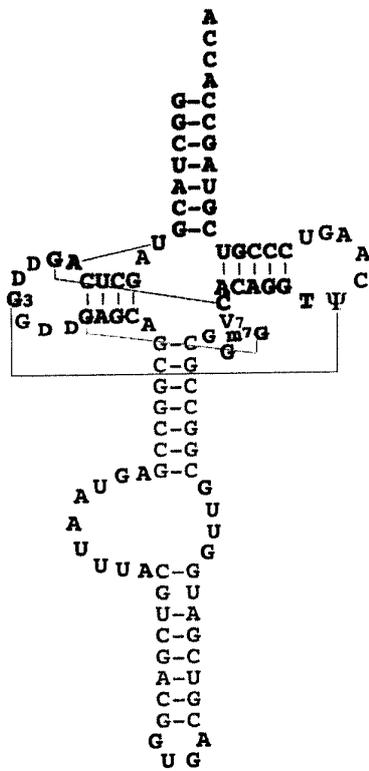
6/7



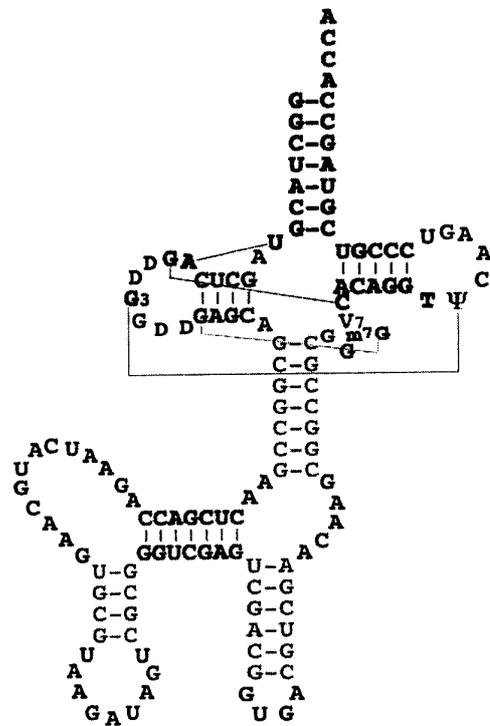
A



B



C



D

Figure 9

- 1 -
LISTAGE DES SEQUENCES

<110> Université Paris 5
CNRS

<120> ARN de transfert chimérique et son utilisation pour la production
d'ARN par une cellule

<130> BFF 06P0037

<160> 25

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 74
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence codant pour un ARN^tLys modifié et incorporant trois
sites de restriction

<400> 1
gcccggatag ctcagtcggt agagcagcgg ccgatatccg cgggtccagg gttcaagtcc 60
ctgttcgggc gccca 74

<210> 2
<211> 75
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence codant pour un ARN^tMet modifié et incorporant trois
sites de restriction

<400> 2
ggctacgtag ctcagttggt tagagcagcg gccgatatcc gcgggtcaca ggttcgaatc 60
ccgtcgtagc cacca 75

<210> 3
<211> 106
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> séquence codant pour un ARN^tLys modifié comprenant un aptamère de
liaison au dextran et incorporant deux sites de restrictions

<400> 3
gcccggatag ctcagtcggt agagcagcgg ccgagtaatt tacgtcgacg gtgacgtcga 60
tggttgcggc cgcgggtcca gggttcaagt ccctgttcgg gcgccca 106

<210> 4
<211> 107
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> séquence codant pour un ARN^tMet modifié comprenant un aptamère de
liaison au dextran et incorporant deux sites de restrictions

<400> 4

- 2 -

ggctacgtag ctca^gttggt tagagcagcg gccgagtaat ttacg^tcgac ggtgacg^tcg 60
 atggttgcgg ccg^cgggtca cagg^ttcgaa tccc^gtcgta gccacca 107

<210> 5
 <211> 140
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Séquence codant pour un ARN^tLys modifié comprenant un aptamère de liaison à la streptavidine et incorporant deux sites de restrictions

<400> 5
 gcccgatag ctca^gtcggt agagcagcg ccgaactcga ccagaatcat gcaag^tgcg^t 60
 aagatag^tcg cgg^gtcgag^t cgacggtgac gtcgaacaag cggccgcggg tccagggt^tc 120
 aagtcctgt tcgggcgcca 140

<210> 6
 <211> 141
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Séquence codant pour un ARN^tMet modifié comprenant un aptamère de liaison à la streptavidine et incorporant deux sites de restrictions

<400> 6
 ggctacgtag ctca^gttggt tagagcagcg gccgaactcg accagaatca tgcaag^tg^cg 60
 taagatag^tc gcgggtcgag tcgacggtga cgtcgaacaa gcggccgcgg gtcacagg^tt 120
 cgaatcccgt cgtagccacc a 141

<210> 7
 <211> 3087
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Vecteur codant pour un ARN^tLys modifié

<400> 7
 gaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcggaatta accctcacta aagggaa^caa 60
 aagctgggta ccgggcccc cctcgagg^tc gccccatcaa aaaaatattc tcaacataaa 120
 aaactttgtg taatacttgt aacgctgaat tcgcccggat agctcag^tcg gtagagcag^c 180
 ggccgatatc cgcggtcca gggttcaagt ccctgttcg^g gcgccactgc agatccttag 240
 cgaaagctaa ggattttttt taagcttgat gggggcttag gatccggagc tccaagcttt 300
 agctccaatt cgccctatag tgagtcgtat tacaattcac tggccg^tcgt tttacaacgt 360
 cgtgactggg aaaaccctgg cgttacc^caa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc 420
 gccagctggc gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca gttg^cgcag^c 480
 ctgaatggcg aatggcctgt agcggcgc^at taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca 540
 gcgtgaccgc tacacttgcc agcgcctag cgcccgtcc tttcgcttc tcccttcc^t 600

- 3 -

ttctcgccac gttcggcggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt	660
tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac	720
gtagtgggccc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct	780
ttaatagtgg actcttgttc caaacttgaa caaactcaa ccctatctcg ggctattctt	840
ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac	900
aaaaatttaa cgcaatttt aacaaaatat taacgtttac aatttaaadc aggtggcact	960
tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg	1020
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt	1080
atgagtattc aacatttccg tgctcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt	1140
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca	1200
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc	1260
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc	1320
cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg	1380
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta	1440
tgcagtgctg ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc	1500
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacacaatgg gggatcatgt aactcgcctt	1560
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg	1620
ccagcagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct	1680
tcccggaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc	1740
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct	1800
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac	1860
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc	1920
tactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat	1980
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg	2040
acaaaatcc cttaacgtga gtttctgctt cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc	2100
aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa	2160
ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag	2220
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtga gccgtagtta	2280
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgta	2340
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag	2400
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg	2460
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcggcacg	2520
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggctcg aacaggagag	2580
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc	2640

- 4 -

cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 2700
aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg 2760
ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct 2820
gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagag cagtgagcga ggaagcggaa 2880
gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcggtggc cgattcatta atgcagctgg 2940
cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcga acgcaattaa tgtgagttag 3000
ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga 3060
attgtgagcg gataacaatt tcacaca 3087

<210> 8
<211> 3088
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Vecteur codant pour un ARN^tMet modifié

<400> 8
ggaaacagct atgaccatga ttacgccaaag ctcggaatta accctcacta aagggaaaca 60
aagctgggta ccgggcccc cctcgaggtc gccccatcaa aaaaatattc tcaacataaa 120
aaactttgtg taatacttgt aacgctgaat tcggctacgt agctcagttg gttagagcag 180
cggccgatat ccgcgggtca caggttcgaa tcccgtcgta gccaccactg cagatcctta 240
gcgaaagcta aggatTTTT ttaagcttga tgggggctta ggatccggag ctccaagctt 300
tagctccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaattca ctggccgtcg ttttacaacg 360
tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttacca acttaatcgc cttgcagcac atccccctt 420
cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttccaac agttgcgcag 480
cctgaatggc gaatggcctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc 540
agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta gcgcccgtc ctttcgctt cttcccttcc 600
tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg 660
ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgatttggg tgatggttca 720
cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttga gtccacgttc 780
tttaatagtg gactcttgtt ccaaacttga acaacactca accctatctc gggctattct 840
tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa 900
caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaa atcaggtggcac 960
ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaata 1020
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 1080
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattccctt tttgcggcat tttgccttcc 1140
tgtttttgct caccagaaa cgctgggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 1200
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 1260
cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggattatc 1320

- 5 -

ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt 1380
 ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 1440
 atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat 1500
 cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 1560
 tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc catacctaac gacgagcgtg acaccacgat 1620
 gccagcagca atggcaacaa cgttgacgaa actattaact ggcgaactac ttactctagc 1680
 ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgag 1740
 ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc 1800
 tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tgtaagccc tcccgtatcg tagttatcta 1860
 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc 1920
 ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 1980
 tttaaaactt ctttttaaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataactctcat 2040
 gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccaactgagcgc tcagaccccg tagaaaagat 2100
 caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 2160
 accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 2220
 ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaataactgtc cttctagtgt agccgtagtt 2280
 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt 2340
 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 2400
 gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt 2460
 ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagcattgag aaagcggccac 2520
 gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggttaagc ggcaggggtcg gaacaggaga 2580
 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 2640
 ccacctctga cttgagcgtc gatttttggtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa 2700
 aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat 2760
 gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc 2820
 tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgcagc aggaagcggg 2880
 agagcggcca atacgcaaac gcctctccc gcgcggttg ccgattcatt aatgcagctg 2940
 gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgcagc aacgcaatta atgtgagtta 3000
 gctcactcat taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg 3060
 aattgtgagc ggataacaat ttcacaca 3088

<210> 9
 <211> 3119
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Vecteur codant pour un ARN^{Lys} modifié comprenant un aptamère de

- 6 -

liaison au dextran

<400> 9
ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcggaatta accctcacta aagggaaaca 60
aagctgggta ccgggcccc cctcgaggtc gccccatcaa aaaaatattc tcaacataaa 120
aaactttgtg taatacttgt aacgctgaat tcgcccggat agctcagtcg gtagagcagc 180
ggccgagtaa tttacgtcga cggtgacgtc gatggttgcg gccgcgggtc cagggttcaa 240
gtccctgttc gggcgccact gcagatcctt agcgaaagct aaggattttt ttttaagcttg 300
atgggggctt aggatccgga gctccaagct ttagctcaa ttcgccctat agtgagtcgt 360
attacaattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc 420
aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc 480
gcaccgatcg cccttccaa cagttgcga gcctgaatgg cgaatggcct gtagcggcgc 540
attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct 600
agcgcgct ctttcgctt tcttccctt ctttctgcc acgttcgccg gctttccccg 660
tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga 720
ccccaaaaa cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 780
ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaacttg 840
aacaacactc aaccctatct cgggctattc ttttgattta taaggattt tgccgatttc 900
ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat 960
attaacgttt acaatttaa tcaggtggca cttttcgggg aatgtgvcg ggaaccctta 1020
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagaca taaccctgat 1080
aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgc 1140
ttattccctt ttttgcgga ttttgccctt ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga 1200
aagtaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcga ctggatctca 1260
acagcggtaa gatccttgag agttttcgc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt 1320
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 1380
gtcgcgcat aactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 1440
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 1500
aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 1560
tgcacaacat ggggatcat gtaactcgc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 1620
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccagcagc aatggcaaca acgttgvcga 1680
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 1740
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 1800
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 1860
atggttaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 1920
aacgaaatag acagatcgtc gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 1980

- 7 -

accaagttta ctcatatata ctttagattg attttaaact tcatttttaa tttaaaagga 2040
 tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagttttcgt 2100
 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc 2160
 tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 2220
 cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 2280
 caaatactgt ctttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 2340
 cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 2400
 cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 2460
 gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 2520
 acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt 2580
 atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 2640
 cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 2700
 gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 2760
 tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg 2820
 tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 2880
 agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggcc aatacgcaaa ccgcctctcc 2940
 ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg 3000
 gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac 3060
 actttatgct tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataacaa tttcacaca 3119

<210> 10
 <211> 3120
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> vecteur codant pour un ARNtMet modifié comprenant un aptamère de liaison au dextran

<400> 10
 ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcggaatta accctcacta aagggaaaca 60
 aagctgggta ccgggcccc cctcgaggtc gccccatcaa aaaaatattc tcaacataaa 120
 aaactttgtg taatacttgt aacgctgaat tcggctacgt agctcagttg gttagagcag 180
 cggccgagta atttacgtcg acggtgacgt cgatggttgc ggccgcgggt cacaggttcg 240
 aatcccgtcg tagccaccac tgagatcct tagcgaaagc taaggatttt ttttaagctt 300
 gatgggggct taggatccgg agtccaagc tttagctcca attcgccta tagtgagtcg 360
 tattacaatt cactggccgt cgttttaca cgctcgtgact gggaaaacc tggcgttacc 420
 caacttaac gccttgacg acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc 480
 cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcc tntagcggcg 540
 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcggcc 600

- 8 -

tagcggccgc	tcctttcgct	ttctttccctt	cctttctcgc	cacgttcgcc	ggctttcccc	660
gtcaagctct	aaatcggggg	ctccctttag	ggttccgatt	tagtgcttta	cggcacctcg	720
acccccaaaa	acttgatttg	ggtgatgggt	cacgtagtgg	gccatcgccc	tgatagacgg	780
tttttcgccc	ttgacgttg	gagtccacgt	tctttaatag	tggactcttg	ttccaaactt	840
gaacaacact	caaccctatc	tcgggctatt	cttttgattt	ataagggatt	ttgccgattt	900
cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	tttaacaaaa	960
tattaacgtt	tacaatttaa	atcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaccctt	1020
atgtgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	tcatgagaca	ataaccctga	1080
taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	1140
cttattccct	tttttgccg	attttgccct	cctgtttttg	ctcaccaga	aacgctggtg	1200
aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	actggatctc	1260
aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	1320
tttaaagttc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgattg	acgccgggca	agagcaactc	1380
ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	cacagaaaag	1440
catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	1500
aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	1560
ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	1620
gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgccagcag	caatggcaac	aacgttgcgc	1680
aaactattaa	ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	1740
gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctggtttatt	1800
gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	actggggcca	1860
gatggtaagc	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	1920
gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	1980
gaccaagttt	actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	atttaaaagg	2040
atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	tcccttaacg	tgagttttcg	2100
ttccactgag	cgtcagacct	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	2160
ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttgtttg	2220
ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	2280
ccaaatactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	2340
ccgcctacat	acctcgtctt	gctaatcctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	2400
tcgtgtctta	ccgggttggg	ctcaagacga	tagttaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	2460
tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	2520
tacctacagc	gtgagcattg	agaaagcgcc	acgcttcccg	aagggagaaa	ggcggacagg	2580
tatccggtaa	gcggcagggt	cggaacagga	gagcgcacga	gggagcttcc	agggggaac	2640
gcctggtatc	tttatagtcc	tgctcgggtt	cgccacctct	gacttgagcg	tcgatttttg	2700

- 9 -

tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcc gcaacgcggc ctttttacgg 2760
 ttcttggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct 2820
 gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctcgccgag ccgaacgacc 2880
 gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgsaa accgcctctc 2940
 cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg 3000
 ggcagtgagc gcaacgsaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta 3060
 cactttatgc ttccggctcg tatgtttgtg ggaattgtga gcgataaca atttcacaca 3120

<210> 11
 <211> 3153
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Vecteur codant pour un ARN^tLys modifié comprenant un aptamère de liaison à la streptavidine

<400> 11
 ggaaacagct atgaccatga ttacgccaa ctcggaatta accctcacta aaggaacaa 60
 aagctgggta ccgggcccc cctcgaggtc gccccatcaa aaaaatattc tcaacataaa 120
 aaactttgtg taatacttgt aacgctgaat tcgcccggat agctcagtcg gtagagcagc 180
 ggccgaactc gaccagaatc atgcaagtgc gtaagatagt cgcgggtcga gtcgacggtg 240
 acgtcgaaca agcggccgcg ggtccagggg tcaagtccct gttcgggagc cactgcagat 300
 ccttagcgaa agctaaggat tttttttaag cttgatgggg gcttaggatc cggagctcca 360
 agctttagct ccaattcgcc ctatagttag tcgtattaca attcactggc cgtcgtttta 420
 caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc 480
 ctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc ccaacagttg 540
 cgagcctga atggcgaatg gcctgtagcg gcgattaag cgcggggggt gtggtggtta 600
 cgcgagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctccttc gctttcttcc 660
 cttcctttct cgccagcttc gccggcttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 720
 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgacccaa aaaacttgat ttgggtgatg 780
 gttcacgtag tgggcatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 840
 cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa cttgaacaac actcaaccct atctcgggct 900
 attcctttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa atgagctga 960
 tttacaacaaa atttaacgag aattttaaca aatatataac gtttacaatt taaatcaggt 1020
 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca 1080
 aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg 1140
 aagagtatga gtattcaaca tttccgtgct gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc 1200
 cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg 1260
 ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt 1320

- 10 -

cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg tggcgcggta 1380
 ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat 1440
 gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga 1500
 gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca 1560
 acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact 1620
 cgcttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc 1680
 acgatgccag cagcaatggc aacaacgttg cgaaactat taactggcga actacttact 1740
 ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt 1800
 ctgctcgcg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt 1860
 ggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt 1920
 atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata 1980
 ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag 2040
 attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat 2100
 ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 2160
 aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca 2220
 aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt 2280
 ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgagc ataccaata ctgtccttct agttagaccg 2340
 tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaatac 2400
 ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgct ttaccgggtt ggactcaaga 2460
 cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 2520
 agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc 2580
 gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca 2640
 ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg 2700
 tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta 2760
 tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 2820
 cacatgttct ttctgctgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcttttgag 2880
 tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcggaggaa 2940
 gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcg gttggccgat tcattaatgc 3000
 agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcacgc aattaatgtg 3060
 agttagctca ctcatagggc accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg 3120
 tgtggaattg tgagcggata acaatttcac aca 3153

<210> 12
 <211> 3154
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

- 11 -

<220>

<223> Vecteur codant pour un ARN^{Met} modifié comprenant un aptamère de liaison à la streptavidine

<400>

```

12
ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcggaatta accctcacta aagggaaacaa      60
aagctgggta ccgggcccc cctcgaggtc gccccatcaa aaaaatattc tcaacataaa      120
aaactttgtg taatacttgt aacgctgaat tcggctacgt agctcagttg gttagagcag      180
cggccgaact cgaccagaat catgcaagtg cgtaagatag tcgcbgggtcg agtcgacggt      240
gacgtcgaac aagcggccgc gggtcacagg ttcgaatccc gtcgtagcca cactgcaga      300
tccttagcga aagctaagga ttttttttaa gcttgatggg ggcttaggat ccggagctcc      360
aagctttagc tccaattcgc cctatagtga gtcgtattac aattcactgg ccgctgtttt      420
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc      480
ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgcctt cccaacagtt      540
gcbgagcctg aatggcgaat ggcctgtagc ggcgcattaa gcgcbggggg tgtggtggtt      600
acgcbgagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc      660
ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgcaag ctctaaatcg ggggctccct      720
ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga tttgggtgat      780
ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc      840
acgttcttta atagtggact cttgttccaa acttgaacaa cactcaacc tatctcgggc      900
tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg      960
atthaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttaaactcagg     1020
tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc     1080
aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag     1140
gaagagtatg agtattcaac atttcctgtg cgcccttatt cccttttttg cggcattttg     1200
ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt     1260
gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt     1320
tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt     1380
attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa     1440
tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag     1500
agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataaact gcggccaact tacttctgac     1560
aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac     1620
tcgcttgatg cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac     1680
cacgatgcca gcagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac     1740
tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact     1800
tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg     1860
tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt     1920

```

- 12 -

tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat	1980
agggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta	2040
gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa	2100
tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga	2160
aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgctg gtaatctgct gcttgcaaac	2220
aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt	2280
tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc	2340
gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta	2400
cctgttacca gtggctgctg ccagtgccga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag	2460
acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc	2520
cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag	2580
cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac	2640
aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg	2700
gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct	2760
atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc	2820
tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga	2880
gtgagctgat accgctcgc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga	2940
agcggagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg	3000
cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt	3060
gagttagctc actcattagg caccacaggc ttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt	3120
gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca caca	3154

<210> 13
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide de coupure des ARNtLys chimériques

<400> 13
 gaaccctgga cccgc 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide de coupure des ARNtLys chimériques

<400> 14
 gctgctctac cgact 15

<210> 15
 <211> 16

- 13 -

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Oligonucléotide de coupure des ARNtMet chimériques
 <400> 15
 gaacctgtga cccagc 16

<210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Oligonucléotide de coupure des ARNtMet chimériques

 <400> 16
 gctgctcaac caact 15

<210> 17
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Domaine epsilon du VHB humain

 <400> 17
 ggcccgtgta tctttacgtc tacattgctg ttgtcgtgtg tgactgtacg c 51

<210> 18
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Domaine de dimérisation du HIV

 <400> 18
 ggccctcggct tgctgagggtg cacacagcaa gaggcgaggc cgc 43

<210> 19
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Aptamère de liaison au vert de malachite

 <400> 19
 ggccatcccg actggcgaga gccaggtaac gaatggatgg ccgc 44

<210> 20
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Fragment de l'ARNr 16S d'E. coli

 <400> 20
 ggcccgtcac accttcgggt gaagtcgggc cgc 33

- 14 -

<210> 21
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Aptamère de liaison à la streptavidine

 <400> 21
 ggccgaactc gaccagaatc atgcaagtgc gtaagatagt cgcggtcga gtcgacggtg 60
 acgtcgaaca agcggccgc 79

<210> 22
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Aptamère de liaison au dextran (sephadex™)

 <400> 22
 ggccgagtaa tttacgtcga cgtgacgtcg atggttgccg cgc 44

<210> 23
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Domaine epsilon du VHB humain

 <400> 23
 tcgacgtgta tctttacgtc tacattgctg ttgtcgtgtg tgactgtaca cgt 53

<210> 24
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Domaine epsilon du VHB de canard

 <400> 24
 tcgacgtact gttcaagcct ccaagctgtg ccttgggtgg ctttacgt 48

<210> 25
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Domaine d'interaction de l'ARNr 23S avec la protéine L20

 <400> 25
 tcgacgtcag ctaaggtccc aaagtcattg gaaaccatgc accgaagcta cgt 53



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche
voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FR 681237
FR 0605304

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99/51755 A2 (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI [US]) 14 octobre 1999 (1999-10-14) * page 4 * * page 6, dernier alinéa - page 7, alinéa 1 * * exemples 3,5 * * figure 1 * * revendication 3 *	1-27	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N
X	BIASOLO M A ET AL: "A new antisense tRNA construct for the genetic treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection." JOURNAL OF VIROLOGY. APR 1996, vol. 70, no. 4, avril 1996 (1996-04), pages 2154-2161, XP002911409 ISSN: 0022-538X * abrégé * * page 2155, colonne de gauche * * figures 1,5 *	1-27	
X	PERRIMAN R ET AL: "Effective ribozyme delivery in plant cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 20 JUN 1995, vol. 92, no. 13, 20 juin 1995 (1995-06-20), pages 6175-6179, XP001026234 ISSN: 0027-8424 * abrégé * * page 6175, colonne de droite * * page 6177 * * figures 1,3 *	1-27	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		24 janvier 2007	Surdej, Patrick
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		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	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35) 5



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

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

N° d'enregistrement
national

FA 681237
FR 0605304

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 96/00232 A (GENE SHEARS PTY LTD [AU]; KEESE PAUL [AU]; STAPPER MARIANNE [AU]; PERR) 4 janvier 1996 (1996-01-04) * page 12 * * page 41 - page 42 * * page 44 - page 45 * * page 49 - page 52 * * figure 9 * * revendications 25-29 * -----	1-27	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	MEDINA M F ET AL: "Design, characterization and testing of tRNA ³ Lys-based hammerhead ribozymes." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 1 APR 1999, vol. 27, no. 7, 1 avril 1999 (1999-04-01), pages 1698-1708, XP002408106 ISSN: 0305-1048 * abrégé * * page 1704 - page 1707 * * figure 11 * -----	1-27	
X	WO 98/55652 A1 (UNIV ROCHESTER [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 10 décembre 1998 (1998-12-10) * page 4 * * page 9 * * exemples 4-7 * -----	1-27	
X	WO 02/44349 A2 (UNIV MCGILL [CA]; CEN SHAN [CA]; KLEIMAN LAWRENCE [CA]) 6 juin 2002 (2002-06-06) * figures 12-15 * * exemple 4 * -----	1-27	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		24 janvier 2007	Surdej, Patrick
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		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	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35) 5



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche
voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 681237
FR 0605304

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>MEINNEL T ET AL: "Fast purification of a functional elongator tRNAm^{et} expressed from a synthetic gene in vivo." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 25 AUG 1988, vol. 16, no. 16, 25 août 1988 (1988-08-25), pages 8095-8096, XP002408107 ISSN: 0305-1048 * le document en entier * -----</p>	1-27	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 janvier 2007		Surdej, Patrick	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique 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 & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35) 5

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0605304 FA 681237**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 24-01-2007

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9951755	A2	14-10-1999 AU 3647799 A	25-10-1999
WO 9600232	A	04-01-1996 AU 703359 B2 AU 2707295 A CA 2193373 A1 EP 0808322 A1 JP 10506261 T US 5998193 A US 6107078 A ZA 9505221 A	25-03-1999 19-01-1996 04-01-1996 26-11-1997 23-06-1998 07-12-1999 22-08-2000 15-03-1996
WO 9855652	A1	10-12-1998 AU 7807098 A US 6355790 B1	21-12-1998 12-03-2002
WO 0244349	A2	06-06-2002 AU 2334902 A US 2004082068 A1	11-06-2002 29-04-2004

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 681237
FR 0605304

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1-27 (toutes partiellement)

Utilisation d'un acide nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique, lequel ARNt chimérique provient de la modification d'un ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de la tige bouche de l'anticodon dudit ARNt par un ARN, pour la production dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans une cellule, ledit ARNt ayant les séquences nucléotidiques SEQ ID No.1 (SEQ ID No. 7) or SEQ ID No.2 (SEQ ID No. 8) . ARNt chimérique, produits et utilisations dérivés dudit ARNt chimérique.

2. revendications: 1-27 (toutes partiellement)

Utilisation d'un acide nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique, lequel ARNt chimérique provient de la modification d'un ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de la tige bouche de l'anticodon dudit ARNt par un ARN, pour la production dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans une cellule, ledit ARNt ayant les séquences nucléotidiques SEQ ID No.3 (SEQ ID No. 9) or SEQ ID No.4 (SEQ ID No. 10) . ARNt chimérique, produits et utilisations dérivés dudit ARNt chimérique.

3. revendications: 1-27 (toutes partiellement)

Utilisation d'un acide nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique, lequel ARNt chimérique provient de la modification d'un ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de la tige bouche de l'anticodon dudit ARNt par un ARN, pour la production dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans une cellule, ledit ARNt ayant les séquences nucléotidiques SEQ ID No.5 (SEQ ID No. 11) or SEQ ID No.6 (SEQ ID No. 12) . ARNt chimérique, produits et utilisations dérivés dudit ARNt chimérique.

La première invention a été recherchée.

1. La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général. 3 inventions séparées sont identifiées. Chacune d'entre elles est caractérisée par un "élément technique spécial"; il n'y a pas d'interrelation technique entre ces inventions (voir ci-dessous).

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 681237
FR 0605304

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

2. Les arguments reflètent l'opinion de l'Autorité de Recherche concernant l'unité d'invention:

2.1. Selon l'Article L.612-4 CPI, la demande de brevet ne peut concerner qu'une invention ou une pluralité d'inventions liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général. Les conditions d'unité d'invention sont remplies lorsqu'il existe une relation technique parmi les inventions impliquant le(s) même élément technique ou des éléments techniques correspondants. L'expression "élément technique spécial" doit être entendu comme un élément technique qui définit une contribution de chaque invention revendiquée considérée dans son ensemble vis-à-vis de l'art antérieur.

2.2. La présente demande ne remplit pas les conditions de l'Article L.612-4 CPI pour les raisons suivantes: D1-D7 (D1: WO-A-9951755, D2: Biasolo et al. 1996 JOURNAL OF VIROLOGY. vol. 70, no. 4, pages 2154-2161, D3: Perriman et al. 1995, PNAS, vol. 92, no. 13, pages 6175-6179, D4: WO-A-9600232, D5: Medina et al. 1999 NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 7, pages 1698-1708, D6: WO-A-9855652, D7: WO-A-0244349) divulguent l'utilisation d'un acide nucléique codant un ARN de transfert (ARNt) chimérique, lequel ARNt chimérique provient de la modification d'un ARNt par insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon dudit l'ARNt et/ou par substitution de tout ou partie de la tige-bouche de l'anticodon dudit ARNt par un ARN, pour la production dudit ARN, ou d'une partie dudit ARN, dans une cellule (e.g. D1: page 4, page 6, dernier paragraphe à page 7, paragraphe 1, exemple 3, exemple 5, fig. 1, revendication 3, D2: abstract, fig.1, page 2155, colonne de gauche, D3: page 6175, colonne de droite, page 6177, fig.1, fig.3, D4: page 12, pages 41 and 42, pages 44-45, pages 49-52, Fig.9, revendications 25-29, D5: abstract, fig.11, pages 1704-1707, D6: page 4, page 9, exemples 4-7, D7: fig.12-15, exemple 4).

La différence entre la demande et l'art antérieur est la nature de l'acide nucléique permettant la production de cet ARN. L'effet dû à cette différence est le même que l'art antérieur, à savoir, la production d'ARN dans une cellule. A la lumière des documents de l'art antérieur les plus proches D1-D7, le problème technique à résoudre est le suivant: la fourniture d'une méthode alternative pour la production d'ARN dans une cellule. La solution de la demande est l'utilisation d'un ARNt chimérique ayant une insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon ou une substitution de la tige-boucle de l'anticodon par un ARN. L'élément technique commun à toutes les solutions de ce problème est le suivant: l'utilisation d'un ARNt chimérique ayant une insertion d'un ARN dans la tige-boucle de l'anticodon ou une substitution de la tige-boucle de l'anticodon par un ARN. L'art antérieur fournit au moins une solution au problème technique et les solutions de l'art antérieur montre toutes les caractéristiques techniques définies ci-dessus.

Il s'en suit qu'il n'existe pas d'élément technique commun pour l'ensemble de l'étendue de la présente demande qui définirait une contribution appréciable (par exemple nouvelle) vis-à-vis de l'art antérieur. Chacune des différentes inventions mentionnées dans les

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 681237
FR 0605304

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

revendications 1 à 27 est considérée une solution indépendante.
Cependant, un regroupement des inventions en 3 groupes a été établi en raison du fait que l'effort pour rechercher les inventions constituant ces groupes n'est pas aussi grand que pour les groupes séparés.

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 681237
FR 0605304

Bien que les revendications 1-11 et 26 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit à la composition.
