

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

# Utilisation de désoxyribozymes contre l'infection par le virus de l'hépatite C

par

Janie Trépanier

Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en virologie et immunologie

Août, 2007

© Janie Trépanier, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Utilisation de désoxyribozymes contre l'infection par le virus de l'hépatite C

présentée par :

Janie Trépanier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns, président-rapporteur

Dr Caroline Alfieri, directeur de recherche

Dr Guy Lemay, membre du jury

Dr Jean-Pierre Perreault, examinateur externe

Dr Daniel Lamarre, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Plus de 123 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite C (VHC). Les patients atteints d'une infection chronique risquent à long terme de développer une cirrhose et un cancer du foie. La thérapie actuelle, composée d'interféron et de ribavirine, ne permet pas d'enrayer l'infection et génère des effets secondaires importants. Ainsi, de nouvelles approches thérapeutiques sont requises afin d'identifier d'autres médicaments qui sont à la fois capables d'éliminer le virus et tolérables par les patients. L'objectif global du projet est d'identifier des désoxyribozymes, petites molécules d'ADN simple brin qui coupent enzymatiquement l'ARN cible, afin de dégrader l'ARN du VHC et ainsi inactiver sa réplication. La méthode utilisée consiste à synthétiser des désoxyribozymes pour couper spécifiquement des sites dans la région conservée encodant la capsid virale. L'efficacité de coupure est d'abord évaluée dans un système biochimique *in vitro*, ensuite *ex vivo* dans les lignées cellulaires et finalement *in vivo* dans la souris. Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* démontrent que les désoxyribozymes dirigés contre l'ARN de la capsid coupent leur cible d'ARN de façon spécifique et efficace. Le désoxyribozyme le plus prometteur a été modifié par l'ajout de groupement 2'-O-méthyle pour améliorer son activité catalytique, renforcer sa résistance aux nucléases et réduire sa toxicité. Son efficacité a ensuite été évaluée par transfection dans des cellules hépatiques contenant l'ARN génomique du VHC. Les résultats de PCR en temps réel ont indiqué que 23,4 nM de désoxyribozyme est suffisant pour réduire de  $63\% \pm 2,7\%$  d'erreur standard moyenne l'ARN génomique du VHC après 24 h. Cette concentration est de 40 fois inférieure à celle utilisée normalement pour ce type de molécule. L'efficacité de notre désoxyribozyme a même permis d'observer par immunobuvardage et par immunofluorescence une réduction remarquable de la protéine de la capsid. Les résultats obtenus démontrent que les nouvelles modifications apportées à cet désoxyribozyme en fait l'un des plus efficace en culture cellulaire. En conclusion, nos résultats indiquent que l'utilisation de désoxyribozymes est une approche thérapeutique prometteuse pour traiter les patients infectés par le VHC.

**Mots-clés** : désoxyribozyme, DNAzyme, antisens, VHC, hépatite C, antiviraux.

## Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infects over 123 million people worldwide. Chronically infected patients may eventually develop cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current therapy with interferon and ribavirin still fails to clear the virus and generates important side effects. The development of more unconventional HCV therapeutics is therefore required to identify novel agents capable of eliminating the virus and be better tolerated by patients. The overall aim of this project is to design deoxyribozymes, small single-stranded DNA molecules with catalytic activity against RNA targets, in order to cleave HCV RNA and stop its replication. The method used consisted in synthesizing deoxyribozymes to specifically cleave the HCV sequence encoding the highly conserved core protein. The cleavage efficiency of deoxyribozymes was first evaluated in an *in vitro* cell-free assay, then *ex vivo* in cell culture and finally, *in vivo* in a mouse model. The *in vitro* and *in vivo* results indicate that the deoxyribozymes directed against the capsid RNA can cleave their target RNA in a specific and efficient manner. The most active deoxyribozyme was then modified by the addition of 2'-O-methyl adducts in order to improve its catalytic activity, increase its half-life and lower its potential toxicity. The efficiency of the modified molecule was then evaluated by transfecting hepatic cell lines containing genomic length HCV RNA. The real-time RT-PCR results indicated that 23.4 nM of this deoxyribozyme was sufficient to reduce the HCV target RNA by 63%  $\pm$  2.7% standard error of the mean after 24 h. This concentration was shown to be 40 times lower than the amount normally reported for this type of molecule. Moreover, there was a corresponding reduction in the viral capsid protein levels as demonstrated by Western blot and immunofluorescence. The results obtained with our modified molecule demonstrate that it is one of the most effective deoxyribozyme in cell culture. In conclusion, our results indicate that the use of deoxyribozymes constitutes a promising therapeutic alternative for HCV infected patients.

**Keywords** : deoxyribozyme, DNAzyme, antisense, HCV, hepatitis C, antivirals.

## Table des matières

Introduction.....	1
1. Virus de l'hépatite C.....	1
1.1. Historique.....	1
1.2. Taxonomie.....	2
1.3. Organisation génomique.....	2
1.4. Cycle répliatif du VHC.....	5
1.4.1. Structure des virions.....	6
1.4.2. Entrée virale.....	6
1.4.3. Traduction.....	8
1.4.4. Réplication.....	9
1.4.5. Assemblage et relâche.....	10
1.5. Génotype.....	10
1.6. Distribution mondiale du virus.....	11
1.7. Pathogénie.....	12
1.7.1. Symptômes.....	13
1.8. Mode de transmission.....	14
1.9. Modèles cellulaires et animaux.....	15
1.10. Thérapie.....	18
1.10.1. Effets secondaires.....	19
1.10.2. Contre-indications.....	20
1.10.3. Traitement des non-répondants.....	21
2. Thérapies alternatives.....	22
2.1. Oligonucléotides antisens.....	25
2.1.1. Mécanismes d'action.....	25
2.1.2. Utilisation contre le VHC.....	27
2.1.3. Essais cliniques.....	28

2.1.4. Avantages et désavantages .....	28
2.2. Ribozymes .....	29
2.2.1. Mécanismes d'action.....	29
2.2.2. Utilisation contre le VHC.....	30
2.2.3. Essais cliniques .....	30
2.2.4. Avantages et désavantages .....	31
2.3. Désoxyribozymes .....	32
2.3.1. Mécanismes d'action.....	33
2.3.2. Utilisation contre le VHC.....	34
2.3.3. Essais cliniques .....	34
2.3.4. Avantages et désavantages .....	34
2.4. ARN interférence .....	35
2.4.1. Mécanismes d'action.....	35
2.4.2. Utilisation contre le VHC.....	37
2.4.3. Essais cliniques .....	38
2.4.4. Avantages et désavantages .....	38
2.5. Aptamères.....	40
2.5.1. Mécanisme d'action .....	40
2.5.2. Utilisation contre le VHC.....	40
2.5.3. Essais cliniques .....	41
2.5.4. Avantages et désavantages .....	41
2.6. Modifications chimiques des antisens.....	42
2.7. Livraison.....	46
2.8. Toxicité et immunogénicité potentielle des oligonucléotides.....	47
2.9. Meilleure application antisens contre le VHC .....	49
3. Objectifs du projet de thèse.....	52
4. Résumé des articles.....	53
Article 1.....	54

Article 2.....	62
Discussion.....	94
Conclusion.....	117
Annexes.....	164
1. Repliement bidimensionnel de l'ARN représentant la région 5'-RNC et la capsid du VHC. ....	164
2. Coupure biochimique de l'ARN de la région 5'RNC-capsid par des désoxyribozymes contenant différentes modifications.....	165
3. Exemples de PCR en temps réel. ....	166
4. Efficacité des désoxyribozymes en culture cellulaire. ....	171
5. Immunofluorescence des cellules HuH-7 après traitement.....	172
6. Détermination de la concentration optimale de désoxyribozymes à utiliser pour les transfections. ....	173
7. Demie-vie de l'ARN génomique du VHC.....	174
8. Évaluation de la toxicité cellulaire de Dz858-4-OMe.....	175
8.1. Évaluation de la prolifération cellulaire.....	175
8.2. Évaluation de l'intégrité membranaire.....	175
9. Expérience préliminaire d'efficacité de coupure dans les souris. ....	176
10. Alignement des séquences du VHC reconnues par Dz858-15-15. ....	177
11. Repliement bidimensionnel de l'ARN représentant la polymérase virale du VHC. ....	187
12. Coupure biochimique de l'ARN de la polymérase virale par différents désoxyribozymes non modifiés.....	188
13. Séquences des désoxyribozymes synthétisés contre la polymérase virale.....	189
14. Exemple d'alignement de séquences de la polymérase virale du VHC.....	189
15. Article de revue. ....	196
Article 3.....	197



## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Évaluation de la viabilité et de la prolifération cellulaire par MTT .....	175
<b>Tableau II.</b> Évaluation de la viabilité par l'intégrité membranaire à l'aide de la LDH....	175
<b>Tableau III.</b> Séquence des désoxyribozymes synthétisés contre la polymérase du VHC	189

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Représentation du génome du virus de l'hépatite C. ....	3
<b>Figure 2.</b> Cycle répliatif du virus de l'hépatite C .....	5
<b>Figure 3.</b> Modèle de l'entrée virale .....	7
<b>Figure 4.</b> Mécanismes d'action des oligonucléotides thérapeutiques .....	24
<b>Figure 5.</b> Composition du domaine catalytique '10-23' .....	33
<b>Figure 6.</b> Modifications nucléotidiques utilisées couramment en thérapie .....	43
<b>Figure 7.</b> Repliement bidimensionnel de l'ARN de la région 5'-RNC et de la capsidie du VHC. ....	164
<b>Figure 8.</b> Coupure biochimique de l'ARN de la région 5'RNC-capsidie du VHC marquée au P <sup>32</sup> par différents désoxyribozymes.....	165
<b>Figure 9.</b> Exemples de PCR en temps réel effectués pour déterminer l'efficacité des désoxyribozymes en culture cellulaire .....	169
<b>Figure 10.</b> Réduction de l'ARN intracellulaire du VHC, de la protéine de la capsidie et de la réactivité antigénique dans les cellules HuH-7 .....	171
<b>Figure 11.</b> Réactivité antigénique des cellules HuH-7 après traitement au Dz858-4-OMe. ....	172
<b>Figure 12.</b> Détermination de la dose optimale de Dz858 à utiliser pour les cotransfections. ....	173
<b>Figure 13.</b> Taux de dégradation de l'ARN viral après transfection dans les cellules HuH-7. ....	174
<b>Figure 14.</b> Pourcentage de coupure de l'ARN viral dans les souris NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ . ....	176
<b>Figure 15.</b> Alignement des séquences du VHC reconnues par Dz858-15-15 .....	186
<b>Figure 16.</b> Repliement bidimensionnel de l'ARN du VHC .....	187
<b>Figure 17.</b> Coupure biochimique de l'ARN de la polymérase du VHC marquée au P <sup>32</sup> par différents désoxyribozymes.....	188
<b>Figure 18.</b> Alignement de séquences de la polymérase du VHC .....	189

## Liste des abréviations

Alb-uPa :	activateur d'urokinase plasminogen sous le contrôle du promoteur d'albumine
ALT :	alanine aminotransférase
ARN :	acide ribonucléique
CLDN1 :	claudin-1
DTAF :	<i>dichlorotriazinyl amino fluorescein</i>
Dz :	désoxyribozyme
EC50 :	<i>50 percent effective dose</i> ; dose efficace à 50 pourcent
eIF :	facteurs d'initiation eukaryotiques
eIF2B $\gamma$ :	la sous-unité gamma du facteur d'initiation eucaryote humain 2B
FDA :	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> ; Administration de la nourriture et des drogues des Etats-Unis
GAG :	glycosaminoglycane
GAPDH :	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GBvB :	<i>hepatitis GB virus B</i> ; virus B de l'hépatite GB
h :	heure
HLA :	<i>human leucocyte antigen</i> ; antigène de leucocyte humain
HPV :	papillomavirus humain
HVR1 :	<i>hypervariable region I</i> ; région hypervariable 1
Hsp90 :	<i>heat shock protein 90</i> ; protéine de choc thermique 90
hVAP-33 :	<i>human homologue of the 33-kDa vesicle-associated protein</i>
IFN :	interféron
IRES :	<i>internal ribosome entry site</i> ; site d'entrée interne du ribosome
IRF-3 :	<i>IFN regulatory factor-3</i> ; facteur régulateur de l'interféron-3

JFH-1 :	<i>Japanese fulminant hepatitis-1</i> ; hépatite japonaise fulminante-1
LDH :	lactate déshydrogénase
LDLR :	récepteur des lipoprotéines de faible poids moléculaires
LNA :	<i>locked nucleic acid</i>
LP :	lipoprotéines
mt :	muté
MTT :	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
NCBI :	National Center for Biotechnology Information
nt :	nucleotide
OMe :	2'-O-méthyle
ON-AS :	oligonucléotide antisens
PAK1 :	<i>p21-activated kinase 1</i> ; kinase activée par p21
PEG :	polyéthylène glycol
PKR :	<i>dsRNA-dependent protein kinase</i> ; protéine kinase dépendante de l'ARN double brin
PNA :	<i>peptide nucleic acid</i>
PS :	phosphorothioate
PTB :	<i>polypyrimidine tract-binding protein</i>
RAG-2 :	<i>recombination activation gene-2</i> ; gène de l'activation de la recombinaison-2
RIG-I :	<i>dsRNA sensor retinoic acid-inducible gene-1</i> ; gène de l'acide rétinoïque qui détecte l'ARN double brin-1
RISC :	<i>RNA-induced silencing complexe</i>
RNC :	<i>non coding region</i> ; région non codante
RSV :	virus respiratoire syncytial
RVS :	<i>sustained viral response</i> ; réponse virale soutenue
Rz :	ribozyme

SELEX :	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SEM :	<i>standard error of mean</i> ; erreur type sur la moyenne
siRNA :	<i>small interfering RNA</i> ; petit ARN interference
SR-BI :	<i>scavenger receptor class B type I</i> ; le récepteur 'scavenger' de classe B type I
TLR-3 :	<i>Toll-like receptor-3</i> ; récepteur Toll-like-3
UI :	unités internationales
VHB :	virus de l'hépatite B
VHC :	virus de l'hépatite C
VHD :	virus de l'hépatite delta
VIH :	virus de l'immunodéficience acquise
VSR :	<i>Rous sarcoma virus</i> ; virus du sarcome de Rous

*Je dédie cette thèse à mes parents sans qui  
cet accomplissement aurait été impossible.*

*Ce qui reste éternellement incompréhensible  
dans la nature, c'est qu'on puisse la  
comprendre.*

Albert Einstein

*Remerciements*

Je désire remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé et supporté au cours de ces années. Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à ma directrice Dr Caroline Alfieri et Dr Jerome Tanner ainsi que Oanh N.L. Le, Dr Richard L. Momparler, Dr Samir Mounir, Dr Norman Kneteman, Dr Elie Haddad, Marie-Pierre Penda-Ekoka, Jing Hu, Valérie Leblond, Janique Viel, Stéphane Pinsonneault, Vincent Wellemans, Souad ElBassam, Roxanne Gendron, Jamila Ennaciri, Arnaud Duval, Dr Sophie Laberge, Dr Hugo Soudeyins, Dr Nikolaus Heveker, Dr José Menezes, Dr Christian Beauséjour ainsi que Philippe Viau-Dupuis pour la correction de cette thèse.

J'aimerais également remercier nos supports financiers : les Instituts de recherche en santé du Canada, les fonds de recherche en santé du Québec, la fondation de l'hôpital Ste-Justine, ainsi que le département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal.

## **Introduction**

### **1. Virus de l'hépatite C**

L'hépatite C est une maladie nécro-inflammatoire du foie causée par une infection du virus de l'hépatite C (VHC). L'infection par ce virus conduit majoritairement à une infection persistante chez l'hôte, dont la manifestation pathologique principale est une hépatite chronique. À long terme, cette hépatite peut aboutir à une cirrhose, avec des risques accrus d'insuffisance fonctionnelle et de développement d'un carcinome hépatocellulaire. Le VHC se réplique principalement dans le foie. Il est estimé que jusqu'à 10% des hépatocytes du foie peuvent permettre la réplication du VHC (Bigger *et al.*, 2001). Étant donné les nombreuses manifestations extrahépatiques que ce virus engendre, il a aussi été suggéré que d'autres types cellulaires et tissus puissent être infectés (Lerat *et al.*, 1998; Forton *et al.*, 2004). L'ARN du VHC a effectivement été détecté dans les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les monocytes et les cellules du tractus digestif (Nouri-Aria *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1998; Lerat *et al.*, 2000; Deforges *et al.*, 2004).

#### **1.1. Historique**

L'existence du VHC a été soupçonnée au début des années 1970, car la plupart des cas d'hépatites liées à des transfusions sanguines n'étaient pas causées par le virus de l'hépatite A ou de l'hépatite B. Pour cette raison, le terme d'hépatite non-A, non-B fut introduit. Les études ultérieures ont démontré que l'agent étiologique des hépatites non-A, non-B pouvait se transmettre de l'homme au chimpanzé (Tabor *et al.*, 1978) et qu'il s'agissait d'un virus à ARN (Bradley, 1985). Dans les années 1980, l'identification et l'isolement du génome du virus responsable des hépatites non-A, non-B sont devenus des enjeux majeurs pour la communauté scientifique et particulièrement l'industrie pharmaceutique.



C'est seulement en 1989 que des chercheurs de la compagnie Chiron Corporation ont identifié le VHC. Ils ont isolé le génome viral et développé une trousse diagnostique pour l'identification du nouveau virus, désormais désigné 'virus de l'hépatite C' (Kubo *et al.*, 1989; Choo *et al.*, 1989). Pour arriver à l'identification du génome viral, ils ont construit une banque d'ADN complémentaire à partir de sérums infectés avec l'agent des hépatites non-A, non-B. Ensuite, les protéines correspondantes ont été exprimées par des phages lambda et criblées avec du sérum provenant d'un patient ayant une hépatite chronique non-A, non-B. Un clone contenant un antigène spécifique de l'agent infectieux provenait d'une molécule d'ARN simple brin de 10 000 nucléotides (nt) (Choo *et al.*, 1989). L'antigène provenant de ce clone fait encore, à ce jour, parti des trousseaux commerciaux pour le diagnostic de l'hépatite C.

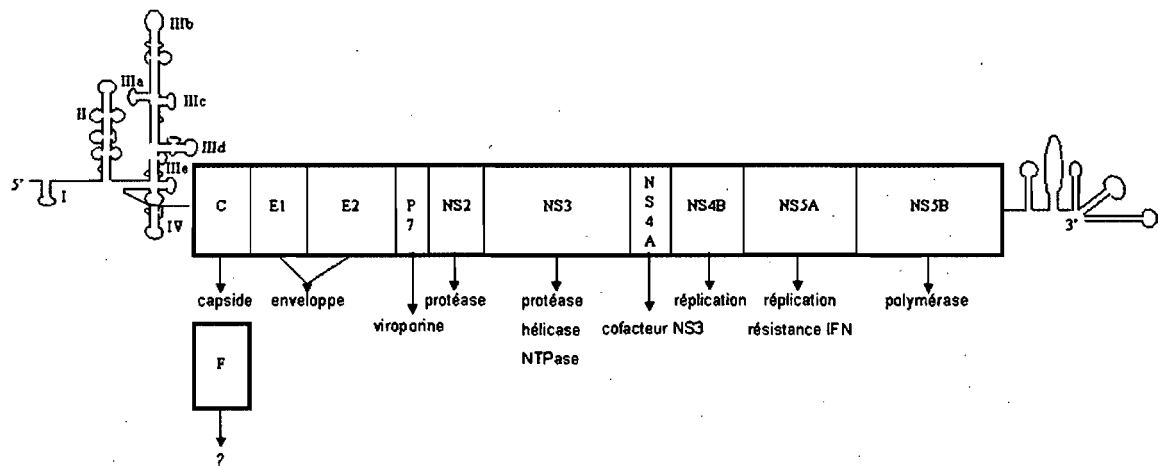
## 1.2. Taxonomie

Le VHC est composé d'un génome d'ARN à sens positif et est classifié dans la famille des *Flaviviridae*. Les *Flaviviridae* sont divisés en trois genres : flavivirus, pestivirus et hepacivirus. Le VHC a été classé avec le virus GBvB dans le genre hepacivirus. Le VHC est très similaire aux autres membres de cette famille en termes d'organisation génomique, de stratégie de répllication de l'ARN viral et de morphologie du virion, mais s'y différencie notamment par son mécanisme de traduction de la polyprotéine. D'autant plus que la majorité des *Flaviviridae* sont transmis aux vertébrés par des arthropodes.

## 1.3. Organisation génomique

Le génome du VHC contient environ 9 600 nt. Il code pour un cadre de lecture ouvert principal situé entre les régions 5' et 3' non codantes (RNC) (Figure 1). La région hautement conservée 5'-RNC de 341 nt est composée de quatre domaines, tel que représenté à la figure 1. Les domaines II à IV contiennent le site d'entrée interne du

ribosome (IRES) servant à la traduction de la polyprotéine. Cet IRES permet de recruter directement la sous-unité ribosomale 40S et d'initier la traduction au codon initiateur AUG (Reynolds *et al.*, 1996). La 5'-RNC est une cible pharmaceutique très attrayante car elle possède une très grande conservation nucléotidique. Le domaine III<sub>d</sub> est particulièrement intéressant car il est directement impliqué dans la liaison de la sous-unité ribosomale 40S (Kieft *et al.*, 1999) et parce qu'il contient une séquence immuable dans tous les génotypes du VHC.



**Figure 1.** Représentation du génome du virus de l'hépatite C. Les structures secondaires prédites pour les régions 5' et 3'-RNC sont représentées. La polyprotéine code pour la capsidie (C), les deux glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2, la protéine p7 et les protéines non structurales (NS), NS2 à NS5B. La protéine F a une fonction encore controversée tel qu'indiqué par un point d'interrogation (consulter le texte pour plus d'information). Tiré de (Trepanier *et al.*, 2006b).

Le cadre de lecture ouvert principal du VHC code pour une polyprotéine qui sera coupée en 10 protéines matures par des enzymes cellulaires et viraux. Les protéines structurales de la capsidie (C), de l'enveloppe (E1 et E2) et la protéine p7 sont générées par des protéases de l'hôte (Harada *et al.*, 1991; Spaete *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 1993). Les protéines non structurales, quant à elles, sont générées par deux enzymes viraux. La

coupure entre NS2-NS3 s'effectue à l'aide d'une protéinase autocatalytique contenue dans NS2 et le domaine N-terminal de NS3 (Selby *et al.*, 1994). La sérine protéinase contenue dans le domaine N-terminal de NS3 coupe les autres jonctions afin de relâcher les protéines NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Bartenschlager, 1999). La protéine NS5B constitue l'ARN polymérase virale. La fonction de chaque protéine est indiquée dans la figure 1. Deux protéines virales ont cependant encore une fonction controversée. De plus en plus d'expériences suggèrent que la protéine p7 du VHC forme des canaux ioniques dans des membranes lipidiques (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003; Premkumar *et al.*, 2004), ce qui classerait cette protéine dans la famille des viroporines.

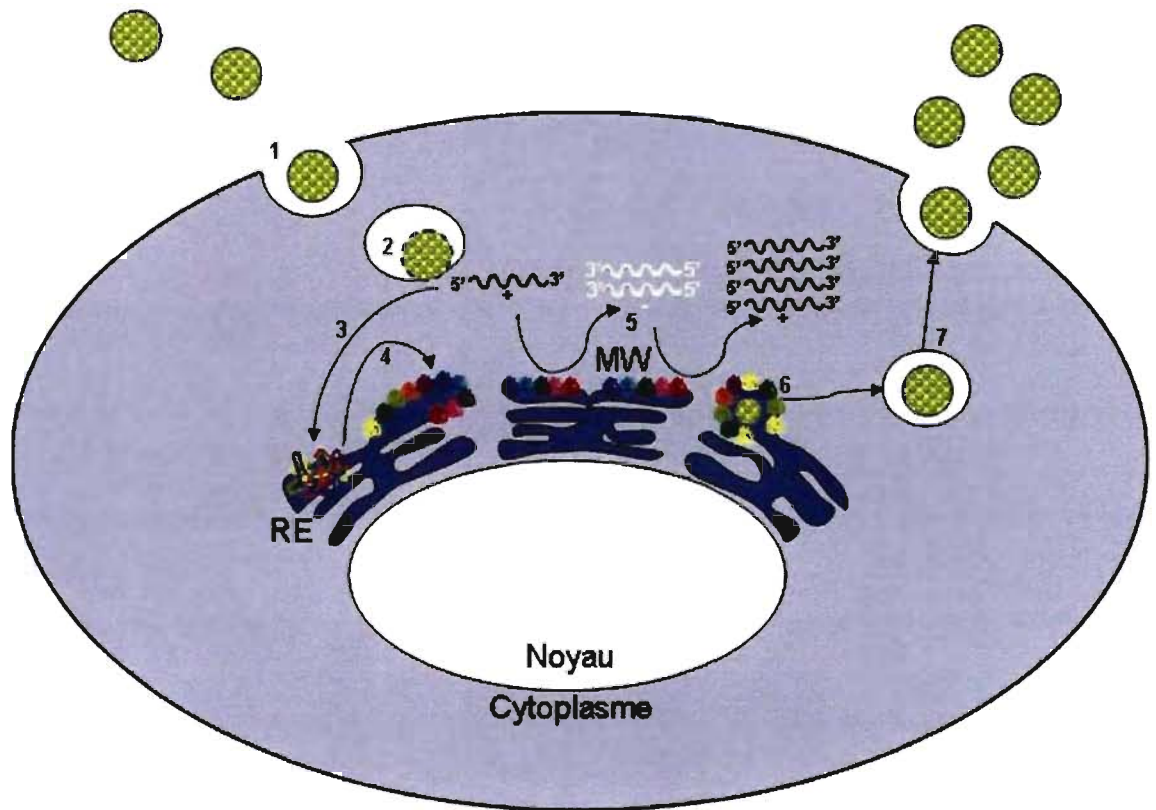
Un second cadre de lecture a été découvert dans le génome du VHC. Ce cadre de lecture alternatif se situe dans la séquence codant pour la protéine de la capsid virale. Il permet l'expression d'une protéine dont la fonction est encore méconnue. Cette protéine a été nommée la protéine F pour 'frameshift protein' (Figure 1) (Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Branch *et al.*, 2005). L'ARN viral codant pour la capsid et la protéine F est donc hautement conservée comparativement aux autres régions encodant les protéines virales. Cependant, il est important de noter que le site de changement de cadre de lecture ainsi que la taille potentielle de la séquence encodant cette nouvelle protéine sont très peu conservés, ceci même à l'intérieur d'un génotype du VHC (Simmonds, 2004).

Finalement, la région hautement conservée 3'-RNC du VHC ne contient pas de séquences de polyadénylation. Elle est essentiellement composée de trois segments formant une structure secondaire stable (Figure 1). Le premier segment est composé d'une séquence variable de 50 nucléotides. Le second segment est constitué d'une répétition d'uridines interrompues par quelques cytidines. Finalement, le dernier segment est formé d'une séquence de 98 nucléotides, désignée 'X tail'. Cette séquence est conservée entre les différents génotypes (Tanaka *et al.*, 1995; Kolykhalov *et al.*, 1996).

La 3'-RNC du VHC est impliquée dans la réplication de l'ARN viral puisqu'elle initie la formation du brin négatif d'ARN. De plus, la 3'-RNC participe à la régulation de la traduction (Ito *et al.*, 1998) et à l'encapsidation de l'ARN (Blight *et al.*, 1998).

## 1.4. Cycle réplcatif du VHC

La dernière décennie de recherche a permis une meilleure compréhension du cycle réplcatif du VHC. Son cycle réplcatif, tel que compris à ce jour, est illustré à la figure 2.



**Figure 2.** Cycle réplcatif du virus de l'hépatite C. 1) attachement et internalisation; 2) décapsidation et relâche cytoplasmique; 3) traduction engendrée par l'IRES; 4) traitement de la polyprotéine; 5) réplication de l'ARN; 6) encapsidation et

assemblage; 7) maturation des virions et relâche. Chaque protéine virale est représentée par une couleur différente. La réplication de l'ARN du VHC se produit dans une altération membranaire spécifique nommée 'membranous web'.

#### **1.4.1. Structure des virions**

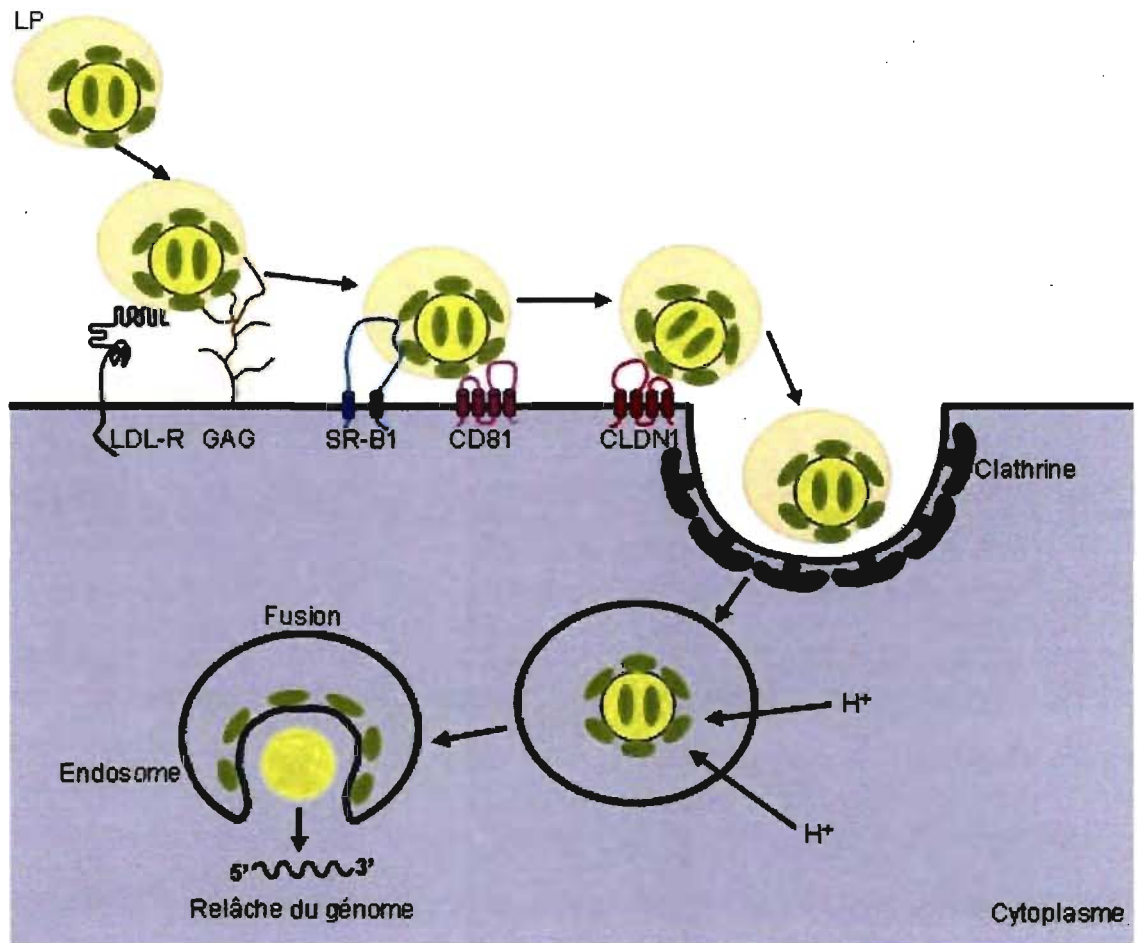
Les virions du VHC semblent avoir un diamètre de 40 à 70 nM, tel que déterminé par filtration et par microscopie électronique (Wakita *et al.*, 2005). Les particules virales du VHC circulent dans l'hôte sous plusieurs formes. Elles peuvent circuler sous forme de virions libres, être associées aux immunoglobulines ou être associées aux lipoprotéines de faible ou de très faible densité (Andre *et al.*, 2005). Cette particularité explique l'hétérogénéité des particules virales, ainsi que leur faible densité (environ 1,10 g/mL).

Les virions sont essentiellement composés de protéines de la capsidie et des glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2. L'ARN génomique est d'abord incorporé dans la nucléocapsidie composée de protéines de la capsidie. Cette nucléocapsidie est à son tour enveloppée dans une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte. Les glycoprotéines de l'enveloppe sont fort probablement ancrées dans cette bicouche lipidique (Cocquerel *et al.*, 2000).

#### **1.4.2. Entrée virale**

Les premières étapes de l'entrée dans la cellule impliquent les protéines structurales du VHC et les récepteurs à la surface des cellules cibles. Les glycoprotéines E1 et E2 sont nécessaires pour l'entrée et la fusion (Bartosch *et al.*, 2003;Nielsen *et al.*, 2004). E1 et E2 sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. Elles s'associent de façon non covalente pour former un complexe hétérodimérique (Deleersnyder *et al.*, 1997). E2 semble initier l'attachement (Rosa *et al.*, 1996;Flint and McKeating, 2000). La région hypervariable 1 (HVR1) de E2 contient des résidus chargés positivement qui

lui permettent d'interagir avec les charges négatives sur les molécules à la surface des cellules. Cette interaction pourrait donc permettre la reconnaissance et l'attachement aux cellules.



**Figure 3.** Modèle de l'entrée virale. Les virions du VHC peuvent être associés aux lipoprotéines (LP). L'attachement du virus à la surface cellulaire et l'entrée impliquent le récepteur des lipoprotéines de faible poids moléculaires (LDLR), les glycosaminoglycans (GAG), le récepteur 'scavenger' de classe B type I (SR-BI), la protéine tétraspanine CD81 et claudin-1 (CLDN1). La protéine CLDN1 est impliquée dans une étape tardive de l'entrée, possiblement aux jonctions serrées des hépatocytes

polarisés. L'internalisation dépend de l'endocytose médiée par la clathrine. L'acidification de l'endosome induit la fusion membranaire des glycoprotéines du VHC. Peu d'information est disponible sur le processus de décapsidation, qui résulte en la relâche du génome viral dans le cytosol. Modèle inspiré de (Moradpour *et al.*, 2007; Helle and Dubuisson, 2008).

Plusieurs molécules à la surface cellulaire ont été proposées comme récepteur pour le VHC (Figure 3). Celles-ci incluent notamment CD81 (Pileri *et al.*, 1998; Petracca *et al.*, 2000), l'héparane sulfate (Barth *et al.*, 2003), le récepteur des lipoprotéines de faible poids moléculaire (LDLR) (Agnello *et al.*, 1999), le récepteur 'scavenger' de classe B type I (SR-BI) (Scarselli *et al.*, 2002) et claudin-1 (Evans *et al.*, 2007). Il a été démontré que CD81, SR-BI et claudin-1 sont tous nécessaires à l'entrée virale. Toutefois, leur présence n'est pas suffisante pour permettre l'entrée dans des cellules non permissives. Il reste donc un ou plusieurs facteurs essentiels à l'entrée virale à découvrir.

Le VHC entre dans la cellule par endocytose médiée par la clathrine (Figure 3), suivi d'un transit dans un endosome de faible pH (Hsu *et al.*, 2003; Tscherne *et al.*, 2006; Blanchard *et al.*, 2006; Koutsoudakis *et al.*, 2006). L'entrée est probablement suivie par une fusion avec l'endosome acidifié (Tscherne *et al.*, 2006; Blanchard *et al.*, 2006). Cette fusion serait probablement produite par la glycoprotéine E1, mais il est possible que la glycoprotéine E2 soit également impliquée (Rosa *et al.*, 1996; Flint *et al.*, 2000). La décapsidation de la nucléocapside virale libère ensuite l'ARN génomique dans le cytoplasme de la cellule.

### **1.4.3. Traduction**

L'ARN génomique de polarité positive sert directement d'ARN messager pour la synthèse de la polyprotéine du VHC. L'IRES initie la traduction de la polyprotéine d'une manière coiffe-indépendante. L'IRES est constitué des domaines II, III et IV de la

région 5'RNC et des 12 à 30 premiers nucléotides de la région encodant la capsid (Honda *et al.*, 1996a). Cet IRES permet de recruter directement la sous-unité ribosomale 40S et d'initier la traduction au codon initiateur AUG (Reynolds *et al.*, 1996). La fonction IRES est un avantage pour les virus car elle permet la synthèse des protéines virales en l'absence de la majorité des protéines cellulaires normalement nécessaires pour la synthèse des protéines de l'hôte. Par contre, plusieurs facteurs cellulaires lient l'IRES du VHC afin d'influencer l'initiation de la traduction. Des structures en haute résolution sont disponibles pour visualiser les éléments critiques de l'IRES du VHC (Kieft *et al.*, 2002b; Lukavsky *et al.*, 2003a).

#### **1.4.4. Réplication**

Les mécanismes de réplication du VHC sont encore peu connus. La réplication du génome du VHC se fait principalement en deux étapes. Premièrement, l'ARN génomique de sens positif sert de matrice à la synthèse d'un brin intermédiaire d'ARN à sens négatif. Ensuite, l'ARN à sens négatif sert à son tour de matrice pour produire plusieurs brins de polarité positive qui serviront soit à la traduction de la polyprotéine, soit à la synthèse de nouveaux intermédiaires de réplication ou à l'encapsidation dans des nouvelles particules virales (Bartenschlager *et al.*, 2004).

L'initiation de la synthèse d'un brin d'ARN à l'extrémité 3' du brin positif ou négatif implique la région 5'-RNC, la région 3'-RNC et l'élément de réplication (5BSL3.2) situé dans la région encodant l'ARN polymérase NS5B (You *et al.*, 2004). La synthèse des brins positif et négatif est effectuée par cette polymérase virale.

La réplication de l'ARN du VHC se produit dans une altération membranaire spécifique nommée 'membranous web' (Figure 2) (Gosert *et al.*, 2003). Cette altération membranaire provient probablement des membranes du réticulum endoplasmique et elle semble être formée par la protéine virale NS4B (Egger *et al.*, 2002; Gretton *et al.*, 2005). Elle est riche en lipides et contient toutes les protéines non structurales du VHC (Egger



*et al.*, 2002). Plusieurs études sont en cours afin de mieux caractériser les facteurs cellulaires impliqués dans la formation de ce complexe de réplication.

#### **1.4.5. Assemblage et relâche**

Peu d'informations sont disponibles sur les étapes tardives du cycle de réplication du VHC. Les protéines de la capsid peuvent s'assembler efficacement en présence de l'acide nucléique pour former des particules similaires à la nucléocapsid (Kunkel *et al.*, 2001). L'interaction entre les protéines de la capsid et l'ARN viral joue sans doute un rôle important dans la transition entre la réplication et l'encapsidation.

Les virions sont possiblement formés par bourgeonnement dans le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi (Serafino *et al.*, 2003). Les nouvelles particules virales semblent quitter la cellule par les voies sécrétoires constitutives.

Le cycle réplcatif du VHC offre une multitude de cibles pour inhiber le virus. Le défi est de cibler spécifiquement le virus afin d'éviter une toxicité pour l'hôte tout en prévenant l'apparition des mutants résistants à la nouvelle drogue.

### **1.5. Génotype**

Une grande partie de la problématique avec le VHC est due à sa diversité génétique. Le taux élevé de mutations dans le génome du VHC est principalement causé par son ARN polymérase qui ne possède pas d'activité de correction d'erreur.

L'analyse des séquences nucléotidiques de variants provenant de patients infectés a permis de classifier le VHC en six génotypes et 52 sous-types [résumé dans (Simmonds *et al.*, 2005)]. Les génotypes se distinguent par une divergence dans leur séquence d'acides aminés d'au moins 30%. À l'intérieur d'un même génotype, les sous-types sont définis par une divergence d'au moins 20%. À l'intérieur d'un sous-type, il y

a une variation maximale de 10% dans la séquence. De plus, les séquences du VHC varient au sein d'un même individu, le virus existant sous la forme d'une quasi-espèce (Lu *et al.*, 2001). Il y a, entre autre, une région dans la protéine de l'enveloppe E2 qui est sujette à un nombre très élevé de mutations. Cette région hypervariable (HVR1) permet d'éviter la reconnaissance par un anticorps neutralisant préexistant (Logvinoff *et al.*, 2004).

Somme toute, le taux élevé de mutations dans le génome du VHC est avantageux car il facilite une plus grande adaptation à la réponse immunologique et une résistance aux traitements antiviraux, ce qui assure une transmission continue de l'infection. Cependant, il est important de se rappeler que certaines régions sont plus conservées que d'autres. Ces régions conservées sont donc de bonnes cibles pour le développement de médicaments antiviraux.

## **1.6. Distribution mondiale du virus**

L'origine et la propagation du VHC dans la population ont été le sujet de nombreuses recherches. Ces informations sont très importantes car elles permettent de prédire l'impact clinique ainsi que de prévenir et mieux contrôler la propagation du virus dans l'avenir.

Étant donné que peu de données sont disponibles pour les pays en voie de développement, il est certain que la prévalence réelle est sous-estimée. Les dernières données épidémiologiques effectuées par l'organisation mondiale de la Santé en 2004 estimaient que 2% de la population mondiale (123 millions d'individus) étaient porteurs chroniques du VHC et que 3 à 4 millions de plus étaient infectées à chaque année (Perz JF *et al.*, 2008). Au Canada, la prévalence du VHC est relativement stable et est inférieure à 1% (Public Health Agency of Canada, 2004). Le génotype 1 infecte la majorité des individus dans le monde. Ce génotype cause 60% des infections au VHC au

Canada et en Europe, 73% des infections aux États-Unis et jusqu'à 85% des infections au Japon (Takada *et al.*, 1993; Andonov and Chaudhary, 1994; Dusheiko *et al.*, 1994; Tawaraya *et al.*, 1995; Blatt *et al.*, 2000; Zein, 2000). Malheureusement, le génotype 1 est celui qui répond le moins au traitement à l'interféron (Poynard *et al.*, 1998; McHutchison *et al.*, 1998a; Fried *et al.*, 2002). D'autres génotypes sont associés à certaines zones géographiques. Par exemple, les infections en Afrique de l'ouest sont principalement causées par le génotype 2 (Mellor *et al.*, 1995). Le génotype 3 se retrouve principalement dans certains pays de l'orient et chez les toxicomanes occidentaux. Les génotypes 4 et 5 sont presque exclusivement africains et le génotype 6 se retrouve uniquement en Asie du sud-est et en Australie (Simmonds, 2004).

Il est étonnant de constater que certains pays comme l'Égypte ont une prévalence très élevée. La prévalence du VHC en Égypte varie entre 15 et 20% selon les régions (Frank *et al.*, 2000). La propagation du génotype 4a en Égypte a été causée par des injections d'agents anti-schistosomiaux pour le traitement de la population contre la bilharziose. Ces injections ont été effectuées avec des aiguilles non stérilisées dans les années 1950 et 1960 (Frank *et al.*, 2000). Il est aberrant de constater que des transmissions de cette sorte ont toujours lieu, à ce jour, dans plusieurs pays en développement. L'organisation mondiale de la santé estime que de 8 à 12 milliards d'injections sont données par année et que plus de la moitié de celles-ci sont données de façon non sécuritaire dans les pays en développement (Kane *et al.*, 1999; Hutin *et al.*, 2003; Hauri *et al.*, 2004).

## 1.7. Pathogénie

L'information sur la pathogénie d'un virus et les conséquences à long terme de cette infection sont très importantes car elles permettent au patient et à son médecin de prendre une décision éclairée sur la nécessité ou non d'entreprendre un traitement; surtout lorsque ce traitement comporte plusieurs effets secondaires importants.

### 1.7.1. Symptômes

L'infection chronique par le VHC conduit à long terme à des problèmes hépatiques plus ou moins sévères. La période d'incubation est d'environ sept semaines (Alter *et al.*, 1989; Koretz *et al.*, 1993b). La majorité des individus infectés (de 60% à 75%) n'éprouvent pas de symptômes durant la phase aiguë (Koretz *et al.*, 1993a). Il est donc difficile pour un médecin de diagnostiquer la primo-infection. Cependant, les patients qui éprouvent des symptômes en phase aiguë souffrent de fatigue, de léthargie, d'anorexie, de douleurs abdominales, de jaunisse, de démangeaisons maculopapulaires et d'arthralgie. Ces symptômes peuvent durer de deux à douze semaines. L'hépatite fulminante est très rare durant cette phase de l'infection.

Une minorité des patients nouvellement infectés (15% à 50%) parviennent à éliminer l'infection. Malheureusement, le VHC cause une infection chronique chez la majorité des personnes infectées (50% à 85%), ce qui est peu commun pour un *Flaviviridae*. Certains patients infectés chroniquement ressentent de la nausée, de la douleur abdominale et du prurit. Une fluctuation du taux d'alanine aminotransférase (ALT) est très caractéristique. L'infection chronique cause une inflammation chronique modérée du foie. Des cycles continus d'inflammation, de nécrose et d'apoptose conduisent éventuellement à la cicatrisation (fibrose) et, éventuellement, à la cirrhose. Le risque de développer une cirrhose après 20 ou 30 ans d'infection est de 2% à 20% (Seeff, 2002). Chaque année, 1% à 4% des patients ayant une cirrhose due au VHC développent un carcinome hépatocellulaire (Seeff, 2002). Un autre 2% à 5% par année développent une insuffisance hépatique et nécessitent une transplantation. À l'heure actuelle, le virus de l'hépatite C est la cause principale de transplantation hépatique en Amérique du Nord (Taylor *et al.*, 2002). Ce phénomène n'est pas dû à la vitesse de la progression de la maladie, mais plutôt au grand nombre de personnes infectées depuis plusieurs dizaines d'années. De plus, environ 40% des patients atteints du VHC

développeront des problèmes extrahépatiques. Le VHC est fortement associé à des maladies rénales, des neuropathies, des lymphomes, la cryoglobulinémie et le syndrome de Sjogren (Mayo, 2003).

La progression de la maladie est aussi influencée par des facteurs reliés au virus, tel que la charge virale, le génotype viral et l'évolution des quasi-espèces. Des facteurs reliés à l'hôte sont aussi importants: l'âge auquel on contracte l'infection, le sexe masculin, la race, l'obésité, la stéatohépatite non alcoolique et la génétique (HLA de classe II). Une coinfection avec le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou la schistosomiase peut également être néfaste. Trois facteurs environnementaux influencent également la progression de la maladie: l'alcool, le tabac et les contaminants environnementaux (Seeff, 2002).

## **1.8. Mode de transmission**

Le VHC se transmet principalement lors d'une exposition percutanée à du sang contaminé. Les voies de transmission dans le monde sont principalement la transfusion de sang n'ayant pas été soumis à un dépistage, ainsi que la réutilisation d'aiguilles et de seringues. Actuellement, le principal facteur de risque dans les pays développés est l'utilisation de drogues injectables. La transmission du VHC a aussi été associée à la transplantation d'organe et à l'hémodialyse (Pereira *et al.*, 1991; Stuyver *et al.*, 1996). La transmission du VHC lors de transfusion sanguine et d'hémodialyse est devenue relativement faible depuis 1990, grâce à l'exclusion des donneurs à haut risque et au développement de tests de dépistage plus sensibles (Donahue *et al.*, 1992). Le risque actuel de contracter le VHC par transfusion sanguine au Canada est inférieur à 1 dans 3 000 000 unités transfusés (Infectious Disease and Immunization Committee CPS., 2006).

Le VHC peut également être transmis sexuellement ou verticalement (d'une mère à son enfant), mais ces modes de transmission sont moins fréquents qu'en cas d'infection par le VIH ou le VHB (Wasley and Alter, 2000; Boucher and Gruslin, 2000; Alary *et al.*, 2005). La prévalence chez les couples sérodiscordants ayant des relations sexuelles non protégées est relativement faible (< 5%) s'il n'y a pas d'autres facteurs de risque (Brettler *et al.*, 1992). La prévalence élevée du VHC chez les travailleuses du sexe est souvent reliée à l'utilisation de drogues injectables (Nakashima *et al.*, 1992). Le risque de transmission verticale du VHC, quant à lui, est estimé à environ 4% à 7%. Ce risque augmente considérablement si la charge virale est élevée ou s'il y a une coinfection avec le VIH (Zanetti *et al.*, 1995; Roberts and Yeung, 2002). Il ne semble pas que le VHC se transmette par l'allaitement (Lin *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 2002). Plusieurs autres activités sont à risque telles que le tatouage, l'inhalation nasale de cocaïne et le partage de lame de rasoir, de coupe ongle ou de brosse à dent (Haley and Fischer, 2001; NIH Expert Panel, 2002; Koblin *et al.*, 2003).

## 1.9. Modèles cellulaires et animaux

L'étude du cycle viral et le développement d'antiviraux ont été entravés durant de nombreuses années par l'incapacité de répliquer le VHC en culture cellulaire. Les premiers clones fonctionnels ont été construits en 1997. Ils ont permis l'infection de chimpanzés par transfection intrahépatique de l'ARN recombinant viral, mais ces génomes infectieux ne se répliquaient pas en culture cellulaire (Kolykhalov *et al.*, 1997; Yanagi *et al.*, 1997). Pour remédier à ce problème, des réplicons d'ARN sous-génomique et génomique ont été construits. Ils contiennent des mutations qui leur permettent de répliquer efficacement l'ARN dans des lignées cellulaires (Lohmann *et al.*, 1999; Blight *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2003; Date *et al.*, 2004). Ces réplicons ont permis d'élucider plusieurs fonctions de l'ARN et des protéines virales. Cependant, les réplicons ne produisent pas de particules virales infectieuses en culture et sont très

atténués *in vivo* (Blight *et al.*, 2002; Bukh *et al.*, 2002; Pietschmann *et al.*, 2002). Les réplicons ont donc été utiles pour élucider des étapes intracellulaires de l'infection. L'entrée virale a, quant à elle, été étudiée à l'aide de pseudoparticules contenant les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Hsu *et al.*, 2003; Bartosch *et al.*, 2003). Cependant, il était toujours impossible d'étudier l'assemblage et la relâche des particules virales infectieuses avec ces systèmes. Cette situation a récemment changé avec la découverte d'un système qui permet la production de particules virales infectieuses en culture cellulaire. Cette révolution est due à la découverte d'un isolat de patient japonais souffrant d'une hépatite fulminante (JFH-1, Japanese fulminant hepatitis-1). Cet isolat de génotype 2a possède une capacité inhabituelle et inexplicée de réplication vigoureuse en culture cellulaire. Les cellules contenant ce génome produisent des virions qui sont infectieux en culture cellulaire et *in vivo* (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). De plus, certaines lignées cellulaires peuvent augmenter la quantité de virus produits en culture. Les cellules hépatiques Huh-7.5 sont très permissives au VHC car elles contiennent une mutation ponctuelle dans le gène RIG-I (dsRNA sensor retinoic acid-inducible gene-I). L'activation de RIG-I par l'ARN double brin, tel que l'ARN du VHC, résulte en la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de régulation-3 de l'IFN (IRF-3), ce qui active la défense antivirale innée. Cette défectuosité, combinée à la faible expression du détecteur d'ARN double brin exogène du récepteur Toll-like-3 (TLR-3) des cellules Huh-7, permet une réplication efficace du VHC dans les cellules Huh-7.5. Ce nouveau système infectieux permettra sans aucun doute l'étude plus approfondie du VHC et facilitera grandement le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'étude du VHC reste toujours très limitée dans les modèles animaux. Le chimpanzé est susceptible à l'infection. Cependant, cet animal est en voie de disparition, reste peu accessible et est très dispendieux (Lanford and Bigger, 2002). De plus, l'infection du chimpanzé résulte souvent en une faible hépatite suivie d'une élimination du virus. Les musaraignes (*Tupaia belangeri*) sont également susceptibles à l'infection

par le VHC (Xie et al., 1998), mais ces petits animaux sauvages s'adaptent mal à la vie de laboratoire et sont difficiles à reproduire, ce qui limite leur utilisation. Comme autre alternative, l'hepacivirus GBvB peut parfois servir de substitut au VHC (Beames *et al.*, 2001). Le virus GBvB peut infecter de petits primates comme les tamarins et les marmosets (Lanford *et al.*, 2003). Ces modèles sont très utiles pour étudier certains aspects du VHC. Par exemple, ils permettent d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs de la protéase du VHC dans des modèles animaux car la protéase du GBvB est similaire à celle du VHC (Scarselli et al., 1997). Ce virus ne permet cependant pas une infection persistante comme on retrouve avec le VHC.

Le meilleur modèle animal serait un petit animal peu coûteux, élevé en laboratoire, qui se reproduit vite et qui est susceptible à l'infection. Afin d'obtenir des rongeurs susceptibles au VHC, une équipe de chercheurs a greffé des hépatocytes humains dans des souris immunosupprimées (Mercer *et al.*, 2001). Les hépatocytes humains ont été transplantés dans des souris transgéniques qui expriment le gène d'urokinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine (*Alb-uPa*). Ce transgène cible la surproduction d'urokinase au foie, ce qui engendre une sous-production de fibrinogène, accélérant ainsi la mort des hépatocytes murins. Certains hépatocytes auront des mutations spontanées dans le transgène, ce qui leur donnera un avantage répliatif sur les cellules avoisinantes et permettra une repopulation du foie par des cellules non transgéniques (Sandgren et al., 1991). De plus, ces souris sont immunodéficientes grâce à une mutation dans le gène RAG-2. Cette immunodéficienc e permet la greffe d'hépatocytes humains. Avec cette technique, 50% des hépatocytes de souris sont remplacés par des hépatocytes humains. Ces hépatocytes humains survivent jusqu'à 35 semaines, ce qui permet d'obtenir une virémie élevée suite à l'infection par du sérum contaminé par le VHC. Cette infection peut ensuite être transmise entre souris. Grâce à ce modèle, il est maintenant possible d'évaluer l'efficacité de plusieurs drogues antivirales. Par contre, ce modèle ne permet pas d'étudier la pathogénèse du VHC car les animaux sont immunodéprimés.



## 1.10. Thérapie

Le traitement d'un virus en mutation constante est un défi de taille. D'autant plus que le VHC produit une quantité énorme de virions dans un patient, soit  $10^{12}$  particules virales par jour (Layden *et al.*, 2000). Aucun vaccin n'est disponible pour prévenir cette infection. Il existe toutefois un traitement qui consiste en une combinaison d'interféron et de ribavirine. Malheureusement, ce traitement permet d'enrayer l'infection chez seulement 55% des patients qui y sont éligibles (Saracco *et al.*, 2003). Il s'agit d'un traitement très dispendieux qui requiert un soutien médical à long terme. De plus, ce traitement demeure inaccessible pour la majorité des porteurs du VHC dans le monde. Nous avons donc désespérément besoin de traitements alternatifs qui permettraient d'enrayer cette pandémie. Le présent chapitre explique en quoi consiste exactement ce traitement et les améliorations lui ayant été apportées au cours des dernières années.

Le premier traitement disponible pour traiter les infections chroniques consistait en trois injections par semaine d'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Ce traitement permettait à seulement 6%-19% des patients d'obtenir une réponse virale soutenue (RVS; absence de détection de l'ARN du VHC dans le sérum du patient 24 semaines après la cessation du traitement). L'ajout d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) à l'IFN augmente sa demi-vie en ralentissant son absorption et en diminuant son élimination systémique, ce qui augmente l'efficacité du traitement et permet de réduire le nombre d'injections à une seule par semaine (Baker, 2001). L'IFN-PEG est maintenant administrée en combinaison avec la ribavirine.

La ribavirine (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) est un analogue de guanosine qui agit comme un antiviral à large spectre (Witkowski *et al.*, 1972). Son mode d'action est controversé. La ribavirine est présentement utilisée pour traiter les patients infectés par le virus respiratoire syncytial (RSV), la fièvre de Lassa et le VHC. Elle n'est pas efficace lorsqu'elle est utilisée en monothérapie contre le VHC

(Di Bisceglie *et al.*, 1995; Dusheiko *et al.*, 1996). Étonnamment, l'utilisation de la ribaviriné combinée à l'IFN augmente dramatiquement le taux de réponse au traitement (Poynard *et al.*, 1998; McHutchison *et al.*, 1998b).

Le traitement est recommandé pour tous les patients, mais surtout pour les patients avec une infection chronique ayant un niveau anormalement élevé d'alanine aminotransférase (ALT), une charge d'ARN viral détectable et une augmentation significative d'inflammation et/ou de fibrose. Les candidats au traitement doivent recevoir une combinaison d'IFN-PEG et de ribavirine sur une période de 24 à 48 semaines, selon le génotype viral. Les patients infectés par le génotype 1 doivent être traités pendant 48 semaines, alors que les patients infectés par les génotypes 2 ou 3 doivent l'être pendant seulement 24 semaines. Les patients ayant un génotype 1 ont une probabilité de 42 à 51% d'atteindre une RVS (Craxi and Licata, 2003). Ceux infectés par les génotypes 2 ou 3 parviennent à répondre au traitement de 24 semaines dans 78 à 82% des cas (Craxi *et al.*, 2003). Vu le manque de données, les patients infectés par les autres génotypes doivent être traités pour une période de 48 semaines. Il est possible de prédire les chances de réussite d'un patient au traitement afin d'éviter de lui faire subir ses effets secondaires et son coût élevé inutilement. Les patients qui n'obtiennent pas une diminution de l'ARN viral d'au moins 2  $\log_{10}$  après 12 semaines de traitement ne parviendront pas à une RVS dans 97% des cas (Ferenci, 2004). L'arrêt du traitement est donc conseillé pour ces patients. Somme toutes, une grande amélioration a été réalisée dans le traitement de l'hépatite C au cours de la dernière décennie (55% vs 20% de RVS avec la l'IFN en monothérapie), mais plusieurs problèmes subsistent.

### **1.10.1. Effets secondaires**

Le traitement du VHC à l'aide d'IFN-PEG et de ribavirine comporte des effets secondaires tellement sévères que 17% des patients doivent en cesser l'utilisation (NIH Expert Panel, 2002). Les symptômes les plus fréquents sont: la fatigue, la fièvre, la

myalgie, les maux de têtes, l'insomnie, l'irritabilité, l'arthralgie, l'anorexie, des dermatites et la dépression (Fried, 2002). L'interféron engendre aussi l'anémie, la leucopénie, la thrombocytopénie et peut parfois causer des rétinopathies et de l'arythmie cardiaque (Wong and Lee, 2006). La ribavirine cause souvent de l'anémie hémolytique et est tératogène. Cet effet, combiné à l'effet abortif de l'IFN, impose l'utilisation de moyens contraceptifs pendant le traitement ainsi que durant les six mois suivant son arrêt. Les recherches n'ont pu démontrer avec certitude que ces médicaments sont excrétés dans le lait maternel, mais les femmes qui allaitent ne devraient pas entreprendre le traitement (Wong *et al.*, 2006).

### **1.10.2. Contre-indications**

Certaines contre-indications ont été émises concernant le traitement des patients infectés par le VHC. Ces exclusions au traitement ont été établies en fonction des effets secondaires générés par ces médicaments. Les contre-indications relatives à l'interféron ou à la ribavirine telles qu'émises par l'Agence de la santé publique du Canada sont : un diabète non contrôlé, une dépression non contrôlée, l'alcoolisme, l'utilisation de drogues illicites et/ou le psoriasis (Agence de la santé publique du Canada, 2003).

Les contre-indications absolues pour les traitements à la ribavirine sont : la défaillance rénale, une maladie vasculaire ischémique, une grossesse, l'incapacité à respecter la contraception obstructive et/ou l'anémie (Agence de la santé publique du Canada, 2003).

Les contre-indications absolues à l'interféron sont : un faible taux de polynucléaires ou de plaquettes, une psychose passée ou présente (traitée ou non), une arythmie cardiaque, des crises cérébrales non contrôlées, une maladie auto-immune et/ou une transplantation d'organes autres que le foie ou la moelle osseuse (Agence de la santé publique du Canada, 2003).

Dans le cas des patients co-infectés par le VIH, le traitement du VHC peut être envisagé pour ceux qui ne présentent aucune contre-indication absolue et ceux chez qui certaines contre-indications peuvent être gérées. Il n'existe aucune raison de croire qu'une approche différente devrait être adoptée pour ces patients. Cependant, la réponse au traitement contre l'hépatite C est moins favorable et les effets secondaires sont plus fréquents (Torriani *et al.*, 2004; Carrat *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2004).

### **1.10.3. Traitement des non-répondants**

Certains traitements alternatifs peuvent être offerts aux patients qui ne sont pas éligibles au traitement, ne répondent pas au traitement ou ne supportent pas les effets secondaires de l'IFN. Par exemple, la combinaison d'une préparation d'acide ursodésoxycholique (Urso) avec une préparation de glycyrrhizine (Stronger Neo Minophagen C) est utilisée pour protéger le foie. Ces drogues inhibent l'inflammation hépatique et diminuent le taux d'ALT sérique; mais elles ne diminuent pas la charge virale du VHC (Koike, 2006). Il est également possible de pratiquer une phlébotomie afin de créer une déficience en fer dans le foie. Cette déficience en fer diminue le taux d'ALT sérique et peut ainsi diminuer le risque de carcinome hépatocellulaire (Kato *et al.*, 2001).

En résumé, le traitement actuel permet d'obtenir une réponse virale soutenue chez 55% des patients qui ont accès au traitement. Cette RVS indique normalement l'élimination du virus dans le foie, une amélioration histologique et l'absence de rechute dans les années à venir (Marcellin *et al.*, 1997; Fabrizi *et al.*, 2008). Cependant, plusieurs chercheurs craignent que, malgré l'élimination du virus dans le sérum, le VHC persiste dans le corps durant de nombreuses années en infectant de façon latente les cellules du système immunitaire (Lee *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2006; Januszkiewicz-Lewandowska *et al.*, 2007). Plusieurs questions concernant ce traitement doivent donc être élucidées.

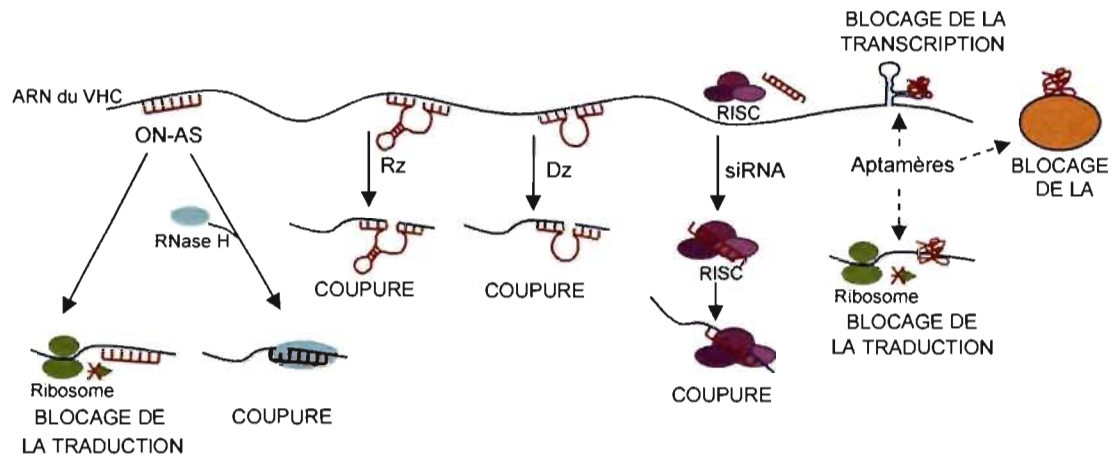
De plus, dû à son coût exorbitant, à ses effets secondaires importants et aux nombreux non répondants, nous avons désespérément besoin de thérapies alternatives.

## 2. Thérapies alternatives

L'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le VHC a été entravée durant de nombreuses années par l'incapacité de cultiver efficacement le virus en culture cellulaire ou dans un modèle animal convenable. La découverte récente d'un système infectieux en culture cellulaire devrait permettre des percées importantes dans ce domaine. Six médicaments sont présentement en phase II d'essais cliniques contre le VHC (revue dans (Manns *et al.*, 2007)). Les cibles les plus visées dans l'élaboration de nouveaux médicaments contre le VHC sont la sérine protéase NS3-4A et l'ARN polymérase NS5B (Sulkowski, 2007; Manns *et al.*, 2007; De Clercq E., 2007). La polymérase virale NS5B peut être inhibée par deux types de composés : les analogues nucléotidiques ou non nucléotidiques. Les analogues nucléotidiques inhibent directement le site actif de la polymérase et engendrent la terminaison de la chaîne (par exemple : valopicitabine (NM-283), MK-0608, R1626 et PSI-6130). Les inhibiteurs non compétitifs se fixent sur un autre site que le site actif de l'enzyme. La polymérase devient alors incapable de se fixer au substrat (par exemple : BILB 1941 et HCV-796). Le premier inhibiteur de polymérase à atteindre la phase IIb d'essai clinique, la valopicitabine (NM-283), a récemment été placé sous tutelle par la FDA (Idenix Pharmaceuticals, 2007). Plusieurs médicaments qui ciblent la protéase NS3 sont également en développement clinique et préclinique, notamment : telaprevir (VX-950), boceprevir (SCH503034), BI12202, MK-7009, TMC435350 et ITMN-191. Les deux agents qui sont les plus avancés en étude clinique sont le telaprevir et le boceprevir. Les données actuellement disponibles sur le telaprevir démontrent que neuf patients sur 17 ayant reçu une combinaison de telaprevir et d'interféron pégylé ont obtenus un taux d'ARN viral inférieur à 10 UI par ml. En ce qui concerne les huit autres patients de

l'étude, quatre ont dû interrompre le traitement en raison des effets secondaires et les quatre autres ne sont pas parvenues à diminuer leur charge virale de façon suffisante (Jacobson *et al.*, 2007). Il a aussi été démontré que certains patients traités avec le telaprevir développent des mutations leur conférant une résistance au médicament (Sarrazin *et al.*, 2007). Par exemple, la mutation A156S confère une résistance au telaprevir alors qu'une mutation T54A confère malheureusement une résistance au telaprevir et au boceprevir (Lin *et al.*, 2004a; Tong *et al.*, 2006). Bien que les résultats des essais cliniques sur ces inhibiteurs soient encourageants, l'effet de plusieurs d'entre eux peut être contourné par la génération rapide de résistance tel que démontré dans de nombreux tests précliniques et cliniques (Trozzi *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004; De Francesco and Migliaccio, 2005; Zeuzem *et al.*, 2005; Courcambeck *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). De plus, certains de ces inhibiteurs s'avèreront toxiques et ne pourront être commercialisés. Par exemple, les essais cliniques très prometteurs des inhibiteurs de protéase BILN-2061 et ACH-806 (GS-9132) ont dû être arrêtés en raison de toxicité cardiaque ou rénale (Frick, 2007; Pottage, Jr. *et al.*, 2007).

Les facteurs de l'hôte impliqués dans l'infection, la réplication ou la pathogenèse du VHC sont aussi d'autres cibles thérapeutiques potentielles. Les récepteurs qui servent à l'entrée virale ou les facteurs impliqués dans la biosynthèse des lipides, du stress oxydatif et de l'immunité innée sont d'intérêts [revue dans (He *et al.*, 2007)]. Par exemple, il a été démontré que la cyclosporine A, un immunosuppresseur, inhibe le VHC. La cyclosporine A cible la cyclophiline B cellulaire qui est impliquée dans la régulation de l'ARN polymérase virale. L'utilisation de cyclosporine A affecte donc dramatiquement la réplication du VHC (Watashi and Shimotohno, 2007). L'idéal serait d'obtenir un analogue de la cyclosporine A qui ne serait pas immunosuppresseur. Le principal défi est de détruire le virus sans affecter le fonctionnement normal de la cellule.



**Figure 4.** Mécanismes d'action des oligonucléotides thérapeutiques. 1) Les oligonucléotides antisens (ON-AS) peuvent bloquer le ribosome afin de prévenir la traduction des protéines. Ils peuvent aussi induire la RNase H cellulaire pour couper l'ARN cible. 2) Les ribozymes (Rz) sont des molécules d'ARN qui se lient et coupent enzymatiquement l'ARN cible. 3) Les désoxyribozymes (Dz) sont composés d'ADN et peuvent aussi se lier et couper directement l'ARN cible. 4) Les ARN interférence (siRNA) sont de petits ARN doubles brins qui s'incorporent dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Un des brins du siRNA dirige le complexe RISC vers les ARNm complémentaires. L'ARN cible est ensuite coupé. 5) Les aptamères lient directement l'ARN ou la protéine pour inhiber la transcription, la traduction ou la fonction protéique. Tiré de (Trepanier *et al.*, 2006b).

Le but ultime du traitement contre l'hépatite C est d'éliminer l'ARN viral et de normaliser le taux d'ALT. Étant donné que le cycle répliatif du VHC implique uniquement de l'ARN simple brin, ce virus est un excellent candidat pour l'utilisation de molécules antisens. Ces molécules synthétiques pourraient bloquer le génome viral, sa traduction, sa transcription et sa répliation. De plus, les antisens peuvent être facilement synthétisés en fonction des mutations virales, ce qui n'est pas le cas des inhibiteurs protéiques. Les oligonucléotides antisens (ON-AS) (Crooke, 2004), les ribozymes (Rz) (Schubert and Kurreck, 2004), les désoxyribozymes (Dz) (Schubert *et al.*, 2004), l'ARN

interférence (siRNA) (Jana *et al.*, 2004) et les aptamères (Bunka and Stockley, 2006) sont toutes des molécules d'oligonucléotides qui se sont avérées très prometteuses dans la suppression d'oncogènes et de virus. Plusieurs sont présentement évalués dans des essais cliniques (McHutchison *et al.*, 2006; Pan and Clawson, 2006; Ireson and Kelland, 2006; Khan, 2006). Chaque plateforme possède un mécanisme d'action distinct qui avantagera ou ralentira sa progression dans les études cliniques (Figure 4). La section suivante consiste en une description de chacune de ces plateformes. Des détails supplémentaires sont disponibles dans l'article de revue inclus dans l'annexe de cette thèse (Trepanier *et al.*, 2006b). Une mise à jour de la littérature ainsi que de l'information complémentaire ont été ajoutés dans les chapitres suivants.

## **2.1. Oligonucléotides antisens**

Le potentiel des ON-AS contre les virus a été démontré pour la première fois en 1978 contre le virus du sarcome de Rous (VSR) (Stephenson and Zamecnik, 1978; Zamecnik and Stephenson, 1978). Depuis, cette technologie a été développée pour inhiber plusieurs gènes. En 1998, Vitravène (Isis Pharmaceuticals) a été le premier ON-AS à être approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour traiter les rétinites causées par le cytomégalovirus chez les patients atteints du SIDA (Roehr, 1998). Plusieurs autres ON-AS sont présentement sous études cliniques [revue dans (Pan *et al.*, 2006)].

### **2.1.1. Mécanismes d'action**

Les ON-AS sont normalement composés de 12 à 25 nucléotides. Ils sont synthétisés chimiquement pour s'hybrider à un ARNm spécifique par appariement de Watson-Crick. Étant donné que les ON-AS non modifiés sont dégradés trop rapidement par les nucléases cellulaires, plusieurs modifications sont utilisées pour augmenter leur demi-vie (Kurreck, 2003). Le mécanisme d'action des ON-AS varie selon les



modifications qu'ils contiennent. Deux mécanismes d'action sont possibles: 1) l'activation de la RNase-H cellulaire pour dégrader l'ARNm; et 2) le blocage stérique pour prévenir l'épissage ou la traduction (Figure 4). La majorité des ON-AS sont construits de façon à activer la RNase H, un enzyme ubiquitaire qui coupe l'ARN suite à la reconnaissance d'un hybride ADN-ARN. Cet hybride sera formé par la liaison de l'ON-AS à son ARN. L'ARN sera ainsi dégradé par la RNase H et l'ON-AS sera recyclé. Le mécanisme de coupure effectué par la RNase H est méconnu mais son activation nécessite que les ON-AS soient chargés négativement, ce qui est le cas des ON-AS contenant des phosphodiesteres ou des phosphorothioates.

Les ON-AS qui fonctionnent par blocage stérique sont incapables d'induire la RNase H. Ils peuvent néanmoins inhiber efficacement la traduction de l'ARNm en bloquant l'épissage, l'initiation de la traduction, l'élongation, le transport nucléocytoplasmique ou la réplication à l'aide d'une ARN polymérase ARN dépendante. L'épissage peut être bloqué par l'hybridation de l'ON-AS aux régions 5' et 3'-RNC impliquées dans le processus. L'initiation de la traduction peut être inhibée en prévenant l'attachement et l'assemblage de la machinerie de traduction. L'élongation peut être arrêtée en bloquant la progression du ribosome. Les ON-AS peuvent même cibler les régions impliquées dans le transport des ARN (Neary and Cho-Chung, 2001). Les ON-AS qui agissent comme bloqueur stérique sont synthétisés avec des modifications qui ne leur permettent pas d'activer la RNase H, soit parce qu'ils ont une charge neutre ou parce qu'ils déstabilisent l'hélice. Les modifications les plus fréquentes sont les 2'-O-méthyles, les LNA et les PNA (Kurreck, 2003).

Les ON-AS qui activent la RNase H sont chargés négativement, ce qui facilite grandement leur livraison dans la cellule. L'activation de la RNase H leur permet aussi d'inhiber l'expression d'une protéine en ciblant pratiquement n'importe quelle région de son ARN. Les bloqueurs stériques sont surtout efficaces contre la région du codon

initiateur, ce qui restreint énormément leur nombre de cible. Les propriétés des différentes modifications sont détaillées à la page 43.

### **2.1.2. Utilisation contre le VHC**

Une panoplie d'antisens ont été synthétisé contre le VHC. En raison du taux très élevé de mutation, les cibles choisies doivent être hautement conservées. L'IRES dans la région 5'-RNC est idéale car elle est hautement conservée et que sa destruction permet de prévenir la transcription et la réplication virale. C'est pourquoi la plupart des ON-AS qui visent l'IRES couvrent les résidus impliqués dans la liaison de la sous-unité ribosomale de la boucle III<sub>d</sub> (Alt *et al.*, 1995; Wu and Wu, 1998; Imanishi and Obika, 2002; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Martinand-Mari *et al.*, 2003b; El Awady *et al.*, 2006). La boucle II, qui contient la région riche en pyrimidine, et la boucle IV, qui contient le codon initiateur AUG, ont également été ciblées dans le but d'inactiver la synthèse protéique (Wakita and Wands, 1994; Mizutani *et al.*, 1995; Seki and Honda, 1995; Hanecak *et al.*, 1996; Vidalin *et al.*, 1996; Alt *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998; Brown-Driver *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001b; McCaffrey *et al.*, 2003; El Awady *et al.*, 2006). D'autres régions conservées du génome ont été ciblées par les ON-AS telles que, la région qui encode la capsid virale (Wakita *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 1997a; Brown-Driver *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2005) et la 'X tail' localisée dans la région 3'-RNC (Smith *et al.*, 2002b). Un autre ON-AS a été construit contre la région qui code pour NS3, même si cette région n'est pas conservée (Heintges *et al.*, 2001). L'efficacité de quelques uns de ces ON-AS a été démontrée chez les animaux (Zhang *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 2001a; McCaffrey *et al.*, 2003).

### 2.1.3. Essais cliniques

Plusieurs autres ON-AS sont en cours d'évaluation cliniques. En ce qui concerne les études cliniques sur le VHC, la compagnie AVI BioPharma (Corvallis, Oregon, Etats-Unis) effectue présentement la deuxième phase de son essai clinique sur AVI-4065, un ON-AS modifié à l'aide de morpholinos (AVI, 2006). Les résultats obtenus *in vitro* et dans les animaux indiquent qu'il peut inhiber tous les géotypes du VHC. La dose efficace à 50 pourcent (EC50) est de 308 nM et son efficacité est pratiquement de 100% à 3  $\mu$ M. Ces données suggèrent qu'AVI-4065 serait capable d'inhiber le VHC chez les patients infectés. De plus, des tests de toxicité effectués avec plusieurs modèles animaux, incluant des primates, ont indiqués que cette drogue est sécuritaire et ne semble pas avoir de dose limitée par sa toxicité. En effet, la première phase de l'étude clinique, effectuée sur 31 volontaires sains injectés durant 14 jours consécutifs, a indiqué aucun effet secondaire sévère (AVI, 2006). Cet ON-AS est donc très prometteur.

La compagnie Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, Californie, Etats-Unis) a également évalué en essais cliniques l'ON-AS ISI-14803. Il est constitué de 20 nt contenant des modifications phosphorothioate et cible le codon initiateur de la polyprotéine du VHC (Hanecak *et al.*, 1996). La phase I de l'étude clinique a permis à seulement trois patients sur 28 d'atteindre une réduction significative de leur charge virale. Cinq de ces patients ont subi une augmentation d'ALT (McHutchison *et al.*, 2006). Il semblerait donc que la compagnie ait décidé d'abandonner ce programme de recherche (Georgopapadakou, 2007).

### 2.1.4. Avantages et désavantages

Les ON-AS sont incapables de couper directement l'ARN cible. Les molécules qui activent la RNase H pour induire la dégradation de l'ARN sont soit rapidement dégradés, soit toxiques. De plus, la RNase H est une enzyme essentiellement nucléaire,

ce qui permet difficilement de cibler efficacement l'ARN cytoplasmique du VHC. Il est toutefois possible de cibler le virus à l'aide de bloqueurs stériques, mais les régions susceptibles sont restreintes. Il serait donc plus approprié d'utiliser des molécules qui peuvent couper directement l'ARN du VHC afin de l'inactiver définitivement.

## 2.2. Ribozymes

Les ribozymes (Rz) sont des molécules d'ARN catalytiques qui lient et coupent une séquence d'ARN spécifique. Ils possèdent un domaine catalytique qui est souvent situé entre des bras de liaison à l'ARN cible (Figure 4). La découverte des ARN catalytiques a conduit à la candidature pour un prix Nobel à Sydney Altman et Thomas Cech pour leur découverte de l'ARN autocatalytique (Kruger et al., 1982). Depuis, plusieurs sortes de Rz ont été découvertes dans des systèmes biologiques ou par sélection *in vitro*. Les Rz naturels ont été classifiés en neuf classes distinctes selon leur taille et leur mécanisme d'action (revue dans (Steele *et al.*, 2003)). Les Rz fabriqués artificiellement sont rarement plus efficaces que les Rz naturels. Le Rz le plus utilisé pour les applications thérapeutiques est le 'hammerhead', un Rz naturel nommé ainsi pour sa forme de marteau.

### 2.2.1. Mécanismes d'action

Les Rz possèdent différents mécanismes d'actions pour couper l'ARN cible [revue dans (Steele *et al.*, 2003)]. Dans la majorité des cas, ils catalysent l'ARN par une réaction de transestérification endonucléotidique. Cette réaction provoque la coupure du lien phosphodiester dans l'ARN cible. Les Rz ont différentes exigences en ce qui concerne leur site de clivage. Par exemple, le motif hammerhead coupe seulement les séquences qui contiennent le motif NUH (où H = U, C ou A). L'utilisation des Rz peut être impossible si l'ARN cible ne contient pas le site de coupure approprié. Après la réaction de coupure, le Rz est libéré et recyclé pour lier et couper une autre ARN cible.

La coupure de cet ARN le rend impossible à traduire et conduit à sa dégradation expéditive par les nucléases cellulaires.

### **2.2.2. Utilisation contre le VHC**

Le potentiel des Rz dans le traitement des patients infectés par le VHC a conduit à l'essai de plusieurs molécules. Les Rz peuvent cibler beaucoup plus de sites dans le génome viral que les ON-AS car ils coupent directement l'ARN. Les séquences ciblées doivent toutefois être hautement conservées. Ces régions doivent également être simple brin pour permettre la liaison du Rz. Quelques équipes de chercheurs ont ciblé les brins positifs et négatifs dans plusieurs régions conservées du génome viral. Cette méthode a réduit efficacement l'ARN en culture cellulaire (Lieber *et al.*, 1996; Welch *et al.*, 1998; Jarczak *et al.*, 2005). La plupart des autres études ont ciblé la région 5'-RNC (Sakamoto *et al.*, 1996; Kruger *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2003; Nadal *et al.*, 2003; Ryu and Lee, 2003; Sabariego *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Romero-Lopez *et al.*, 2005; Gonzalez-Carmona *et al.*, 2006), la région de la capsid virale (Sakamoto *et al.*, 1996; Welch *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1998) ou la région 3'-RNC (Swiatkowska *et al.*, 2007).

Les Rz sont également utilisés à des fins non thérapeutiques. Par exemple, ils peuvent servir à la détection de l'acide nucléique du VHC (Kossen *et al.*, 2004) ou à l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans le cycle répliatif du VHC (Kruger *et al.*, 2000).

### **2.2.3. Essais cliniques**

Beaucoup d'études ont démontré le potentiel des Rz comme agents antiviraux et un bon nombre d'études cliniques sont en cours. La compagnie Ribozyme Pharmaceuticals Inc, maintenant connue sous le nom de Sirna Therapeutics (San Francisco, Californie, Etats-Unis), a développé un Rz contre le VHC. Ce Rz, nommé

Heptazyme<sup>TM</sup>, est composé de 33 nt modifiés à l'aide de phosphorothioates. Il est dirigé contre la région 5'-RNC de l'ARN viral. Les premiers tests effectués à l'aide d'une chimère du virus de la polio contenant l'IRES du VHC ont permis de démontrer que ce Rz inhibe efficacement la réplication en culture cellulaire et que son effet est intensifié par l'IFN (Macejak et al., 2000). Des souris ont également été utilisées pour démontrer la distribution du Rz dans le foie (Lee et al., 2000). La phase I de l'essai clinique effectué sur 24 patients n'a pas démontré de toxicité. La phase II a même permis de démontrer une réduction significative de l'ARN du VHC dans le sérum chez 10% des patients. La compagnie a malheureusement dû interrompre cet essai clinique, car un animal est devenu aveugle 12 mois après une étude toxicologique impliquant trois fois la dose maximale anticipée chez les humains. Il est incertain si l'évènement est relié à l'utilisation de la drogue ou non. Le développement d'Heptazyme<sup>TM</sup> a toutefois été interrompu.

#### **2.2.4. Avantages et désavantages**

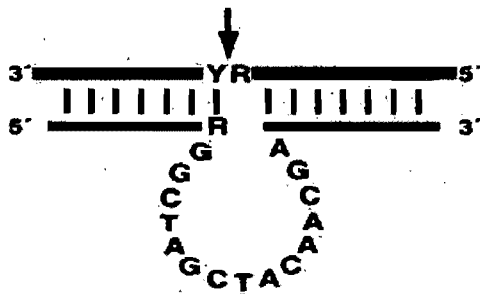
Les principaux avantages des Rz par rapport aux ON-AS sont de modifier de manière permanente leur substrat en le coupant pour être ensuite recyclés afin d'effectuer d'autres réactions. Les Rz sont constitués d'ARN, ce qui leur confère l'avantage de pouvoir être administrés par un plasmide ou un vecteur viral pour éviter leur dégradation par les nucléases extracellulaires. De plus, l'utilisation d'un plasmide offre la possibilité de restreindre l'expression du Rz dans un tissu à l'aide d'un promoteur spécifique et de générer un apport continu de Rz. L'utilisation d'un vecteur ne permet cependant pas de modifier les Rz. Si l'on souhaite modifier les Rz, ils devront être injectés directement dans le patient ou enrobés dans des polymères. Il est également possible d'utiliser une chimère contenant de l'ADN. L'ajout d'ADN dans la structure du Rz permet d'augmenter son activité catalytique et sa stabilité *in vivo* (Taylor et al., 1992). Cette donnée suggère qu'une molécule d'ADN catalytique pourrait être plus attrayante due à sa plus grande résistance aux nucléases.

### 2.3. Désoxyribozymes

Les désoxyribozymes (Dz) sont de petites molécules d'ADN simple brin qui peuvent lier et couper une séquence d'ARN précise. Ils sont aussi connus sous le nom de 'DNAzymes' ou de 'DNA enzyme'. Tout comme les Rz, les Dz sont constitués d'un domaine catalytique localisé entre deux bras de liaison à l'ARN (Figure 4). Ils sont très spécifiques et peuvent couper l'ARN cible tout en ayant une bonne résistance aux nucléases.

Les Dz ont été obtenus par sélection *in vitro* à l'aide d'une librairie aléatoire d'acides nucléiques. Ces sélections ont permis de créer plusieurs sortes d'ADN catalysant différentes réactions telles que: la coupure d'ARN, d'ADN ou de liens glucosidiques et la liaison de l'ADN ou des porphirines de métalate [revue dans (Emilsson and Breaker, 2002)]. Le premier ADN capable de couper enzymatiquement de l'ARN a été répertorié en 1994 (Breaker and Joyce, 1994). Le plus efficace est le Dz '10-23' (Figure 5). Il a été nommé ainsi car il correspond au 23ième clone du 10ième cycle de la sélection *in vitro* (Santoro and Joyce, 1997). Le Dz '10-23' contient un domaine catalytique de 15 nucléotides qui coupe la jonction entre une purine seule et une pyrimidine en paire. L'efficacité de coupure entre ces deux bases est favorisée par certaines séquences : AU = GU  $\geq$  GC  $\gg$  AC (Cairns *et al.*, 2003). Cette nécessité d'avoir une purine et une pyrimidine signifie qu'il peut cibler le codon initiateur AUG de n'importe quel gène.

Aucun Dz n'a été retrouvé dans la nature jusqu'à présent. Cependant, il a été démontré que la dépurination d'une guanine spécifique peut être accélérée de 3000 fois par une tige-boucle contenant la séquence 5'-GTGG-3' suivie de la paire de base TA à la base de la boucle (Amosova *et al.*, 2006). Aucun cation divalent ou autre cofacteur n'est requis pour la réaction. Cette réaction implique que l'ADN soit capable de catalyser des réactions dans la nature. Il est donc possible que des désoxyribozymes naturels existent.



**Figure 5.** Composition du domaine catalytique '10-23', modifié de (Santoro *et al.*, 1997). Le désoxyribozyme (brin inférieur noir) lie le substrat d'ARN (brin supérieur vert) par un appariement conventionnel Watson-Crick. La coupure se produit à la position indiquée par la flèche. R = A or G; Y = U or C. Inspiré de (Santoro *et al.*, 1997).

### 2.3.1. Mécanismes d'action

Le Dz lie d'abord son ARN cible par un appariement Watson-Crick. Ensuite, il utilise l'énergie de sa liaison pour tordre et altérer la basicité du substrat (Geyer and Sen, 2000). La plupart des Dz coupent l'ARN par transestérification. La coupure dans l'ARN est effectuée par l'oxygène situé dans le groupe 2'-hydroxyle de l'ARN. Cet atome d'oxygène sert de nucléophile pour attaquer le centre phosphorique du lien phosphodiester adjacent.

L'inhibition de l'expression des gènes peut être attribuée à l'activité de coupure de l'ARN, mais elle peut également être causée par l'activité antisens engendrée par la liaison du Dz à son ARN cible. La contribution de l'activité antisens peut être évaluée en inactivant le domaine catalytique du Dz. Dans le cas du modèle '10-23', ce Dz inactivé est obtenu en remplaçant la thymine en position 4 du domaine catalytique par une guanine (Figure 5). Le remplacement de la guanine en position 6 par une cytosine peut également être utilisé pour abolir l'activité enzymatique (Santoro and Joyce, 1998).



### **2.3.2. Utilisation contre le VHC**

Quelques Dz ont été synthétisés contre le VHC. Deux Dz dirigés contre la région 5'-RNC ont réduit de 45% et de 67% l'activité de la luciférase exprimée sous le contrôle de l'IRES du VHC (Oketani *et al.*, 1999). D'autres Dz ciblant la région 5'-RNC ont efficacement réduit le niveau d'un ARN synthétique du virus *in vitro* ou en culture cellulaire (Yu *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2005; Vlassova *et al.*, 2006). Notre laboratoire a dessiné plusieurs Dz contre la région encodant la capsid virale (Trepanier *et al.*, 2006a). Un d'entre eux, désigné Dz858, a réduit de 63% l'ARN génomique du VHC en culture cellulaire (voir les articles attachés). Notre étude fut la première à utiliser comme cible l'ARN génomique du VHC. Finalement, la 'X-tail' a également été ciblée (Smith *et al.*, 2002b).

### **2.3.3. Essais cliniques**

Aucun essai clinique sur les Dz n'a été rendu public à ce jour. Leur efficacité a cependant été démontré dans plusieurs modèles animaux et les Dz se sont montrés efficaces contre une panoplie de gènes [revue dans (Khachigian, 2002; Dass, 2004)].

### **2.3.4. Avantages et désavantages**

Tout comme les Rz, les Dz ont comme avantages majeurs de pouvoir modifier de manière permanente leur substrat en le coupant et d'être ensuite recyclés pour pouvoir effectuer d'autres réactions. Les Dz possèdent également plusieurs autres avantages par rapport aux Rz et aux ON-AS: ils sont plus résistants aux nucléases, moins dispendieux, plus facile à synthétiser, possèdent une plus grande spécificité, une plus grande flexibilité pour le choix des cibles (Kuwabara *et al.*, 1997) et sont souvent plus efficaces (Goila and Banerjea, 1998; Santoro *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 1999; Kurreck *et al.*, 2002). Ces nombreux avantages les rendent très intéressants pour les applications

thérapeutiques. Le seul inconvénient par rapport aux Rz est qu'ils ne peuvent pas être administrés par un plasmide ou un vecteur viral. Par contre, les Dz peuvent être modifiés facilement pour être administrés sans vecteur. Le potentiel des Dz doit cependant être démontré par des essais cliniques.

## **2.4. ARN interférence**

La découverte de l'ARN interférence a créé une révolution dans le domaine de l'inhibition des gènes. Ce phénomène a été découvert pour la première fois en 1990. L'équipe de Jorgensen a introduit un vecteur contenant un gène pour pigmenter les pétunias d'une couleur pourpre, mais à leur grande surprise, certains pétunias sont devenus blancs. Le gène qu'ils ont introduit a éteint le gène naturel (Napoli *et al.*, 1990). Ensuite, en 1998, il a été découvert que l'introduction d'ARN double brin dans *Caenorhabditis elegans* réduit spécifiquement l'expression des protéines du nématode (Napoli *et al.*, 1990; Fire *et al.*, 1998). Ce phénomène a alors été nommé ARN interférence. Cette découverte a tellement révolutionné la science que les auteurs de ces travaux se sont vu décernés le prix Nobel de médecine en 2006. Cependant, l'introduction d'ARN double brin ne peut être utilisée en thérapie car sa présence stimule la voie de l'IFN dans la cellule. En 2001, Thomas Tuschl a eu la brillante idée d'introduire seulement de petits ARN double brins (siRNA) de 21 nt dans les cellules (Elbashir *et al.*, 2001). Cette méthode a permis de stimuler l'ARN interférence sans provoquer la voie de l'IFN.

### **2.4.1. Mécanismes d'action**

La recherche sur l'ARN interférence a créé un tel engouement que son mécanisme d'action a été éclairci rapidement (Figure 4). Dans les organismes inférieurs, les ARN double brins présents dans une cellule sont tout d'abord pris en charge par une ribonucléase de type III appelée Dicer. Celle-ci clive l'ARN double brin en fragments de

21 à 23 paires de base contenant 2 nt en ballants de chaque côté. Dicer transfère alors ces petits ARN (siRNA) au complexe multiprotéique cellulaire RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Un des brins du siRNA, dit passager, est éliminé tandis que l'autre dirige le complexe RISC vers les ARNm complémentaires au brin restant. Les deux brins peuvent guider la réaction, mais celle-ci est plus efficace lorsque c'est le brin antisens qui est incorporé dans le complexe RISC. Si la complémentarité entre le siRNA et l'ARNm cible est quasi parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine. Ce mécanisme peut être tellement spécifique qu'il peut parfois différencier la présence d'un seul nucléotide non complémentaire. Cette propriété peut permettre de cibler un ARNm porteur d'une mutation ponctuelle sans affecter l'ARNm sauvage (Brummelkamp *et al.*, 2002; Yokota *et al.*, 2004). Cependant, une deuxième voie peut être utilisée par les siRNA lorsque leur séquence n'est que partiellement complémentaire au centre de la région de reconnaissance (Matranga *et al.*, 2005). Cette faible complémentarité peut donc inhiber l'expression de gènes non visés lorsqu'ils possèdent une homologie de séquence avec le gène ciblé (Jackson *et al.*, 2003). Cette découverte implique que les siRNAs peuvent avoir des effets secondaires importants.

Dans les cellules de mammifère, l'ARN double brin de plus de 30 paires de bases induit la voie de l'IFN qui active la PKR (dsRNA-dependent protein kinase), la 2',5'-oligoadénylate synthétase et la RNase L. Ces activations bloquent la synthèse protéique et conduisent à la mort cellulaire. La suppression de gène peut toutefois être effectuée sans activer l'IFN en utilisant des siRNAs de 21 nt (Elbashir *et al.*, 2001). Néanmoins, quelques études ont indiquées que certains siRNA peuvent parfois activer l'IFN (Sledz *et al.*, 2003; Scacheri *et al.*, 2004). Le mécanisme d'action doit donc être complètement élucidé avant leur utilisation dans les humains.

## 2.4.2. Utilisation contre le VHC

L'efficacité des siRNA a été démontrée contre une quantité impressionnante de gènes. Plusieurs laboratoires ont évalué leur capacité à inhiber l'expression des gènes et de la réplication du VHC. Presque toutes les régions du génome ont été ciblées: la 5'-RNC (Yokota *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2003; Kronke *et al.*, 2004; Ilves *et al.*, 2006; Prabhu *et al.*, 2006; Hamazaki *et al.*, 2006; Kanda *et al.*, 2007; Chevalier *et al.*, 2007), la capsid (Randall *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Hamazaki *et al.*, 2006), E2 (Liu *et al.*, 2006), NS3 (Kapadia *et al.*, 2003; Takigawa *et al.*, 2004), NS4B (Randall *et al.*, 2003), NS5A (Sen *et al.*, 2003), NS5B (Kapadia *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Takigawa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005) et 3'-RNC (Smith *et al.*, 2007). Une équipe a même utilisé plusieurs siRNAs pour cibler six régions du génome; 5'-RNC, NS3, NS4A, NS4B, NS5B et 3'-RNC. La combinaison de tous ces siRNAs a permis d'inhiber la réplication du VHC à 90% (Korf *et al.*, 2007). Cette méthode démontre que la combinaison des drogues permet d'obtenir de bien meilleurs résultats.

Les siRNAs ont également été utilisés chez la souris pour prévenir l'hépatite fulminante en inhibant l'apoptose engendrée par le gène Fas (Song *et al.*, 2003). Cette étude a également permis de démontrer que les siRNAs peuvent se localiser dans le foie, l'organe cible du VHC.

Les siRNAs peuvent aussi être très utiles pour identifier les protéines cellulaires impliquées dans le cycle viral. L'utilisation des siRNAs pour inhiber l'expression de plusieurs gènes dont: la protéine kinase C, la peroxydase glutathione gastrointestinale, la protéine associée à NS1, l'autoantigène La, l'ARN hélicase p68, le hVAP-33, la PTB, eIF2Bgamma, l'actine-alpha, la kinase activée par p21 (PAK1), USP18 et la protéine de choc thermique 90 (Hsp90), a permis de confirmer que toutes ces protéines sont impliquées dans le cycle viral du VHC (Costa-Mattioli *et al.*, 2004; Goh *et al.*, 2004; Gao

*et al.*, 2004;Zhang *et al.*, 2004;Kim *et al.*, 2004a;Kim *et al.*, 2004b;Morbitzer and Herget, 2005;Randall *et al.*, 2006a;Xue *et al.*, 2007;Ishida *et al.*, 2007;Nakagawa *et al.*, 2007;Ng *et al.*, 2007). Ces protéines constituent ainsi des cibles thérapeutiques potentielles.

### **2.4.3. Essais cliniques**

Deux compagnies, Sirna Therapeutics (San Francisco, Californie, Etats-Unis) et Benitec (Melbourne, Australie), ont développé des siRNAs contre le VHC. La phase I des essais cliniques devrait débuter sous peu. Il est possible que les essais cliniques de Sirna Therapeutics soient quelque peu retardés en raison de leur nouvelle association avec Merck Frost (Whitehouse Station, NJ, Etats-Unis).

### **2.4.4. Avantages et désavantages**

L'ARN interférence a probablement été sélectionnée au cours de l'évolution comme moyen de protection contre l'introduction de génomes étrangers, particulièrement contre ceux des virus. Cette technologie est très utile pour comprendre la fonction de certains gènes cellulaires, valider la cible de certaines drogues ou traiter des maladies. Les siRNAs sont très sensibles aux nucléases, l'utilisation d'un vecteur est donc recommandée.

L'utilisation des siRNAs représente également des risques. Quelques études ont indiquées que certains siRNA peuvent activer l'IFN malgré leur courte taille de 21 nt (Sledz *et al.*, 2003;Scacheri *et al.*, 2004). Il est également possible qu'ils inhibent l'expression de gènes non visés qui possèdent une homologie de séquence avec le gène ciblé (Jackson *et al.*, 2003). Cette découverte implique que les siRNAs peuvent avoir des effets secondaires importants. De plus, comme cette technologie utilise la machinerie cellulaire pour dégrader les ARN cibles, il y a un risque de saturer le complexe RISC et d'interférer avec les voies cellulaires normales. Afin d'éviter ces conséquences, il est très

important d'utiliser seulement les siRNAs qui sont efficaces à de très faibles concentrations.

L'ARN interférence est une approche attirante car elle peut être hautement spécifique. La spécificité de certains siRNAs peut être tellement grande que la mutation d'une seule paire de base peut abolir complètement son activité (Brummelkamp *et al.*, 2002;Kawasaki and Taira, 2003;Yokota *et al.*, 2004). Cette grande spécificité peut donc nuire lorsqu'on désire utiliser cette technologie contre des virus à ARN possédant un taux de mutation élevé. Les mutations générées risquent de permettre au virus d'échapper aux siRNAs. Ce phénomène a effectivement été démontré avec plusieurs virus à ARN. Le virus de polio et le VIH sont devenus résistants à des siRNAs grâce à une seule mutation ponctuelle dans la région ciblée (Gitlin *et al.*, 2002;Boden *et al.*, 2003). Trois équipes différentes ont également noté que l'utilisation de siRNAs contre le VHC provoque l'apparition de mutants résistants à l'ARN interférence (Randall *et al.*, 2003;Wilson and Richardson, 2005;Wilson and Richardson C, 2005;Konishi *et al.*, 2006). Cette découverte indique que le traitement d'un patient avec des siRNAs pourrait provoquer l'émergence très rapide de virus résistants au traitement.

Le VHC devrait normalement être inactivé par l'ARN interférence étant donné que sa réplication génère de l'ARN double brin dans la cellule. Au contraire, ce virus cause une infection persistante. Il est donc fort possible qu'il ait développé des mécanismes pour inhiber la coupure des ARN double brin par l'enzyme Dicer. Une équipe a effectivement démontré que la protéine de la capsid du VHC interagit directement avec l'enzyme Dicer pour contourner l'ARN interférence et ainsi permettre la réplication de l'ARN viral dans la cellule (Wang *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré par deux laboratoires que plusieurs composantes de l'ARN interférence sont impliquées dans la réplication du VHC (Wilson *et al.*, 2005;Wilson and Richardson C, 2005a;Randall *et al.*, 2006b). Une des protéines du complexe RISC, Argonaute 2,

s'associe à NS5A et NS5B lors de la réplication du virus. Le VHC interagit donc avec plusieurs composantes de la machinerie responsable de l'ARN interférence.

Il est important de noter que les études qui ont démontré l'efficacité des siRNAs contre le VHC en culture cellulaire ont utilisé le système des réplicons. Étant donné que les réplicons ne représentent pas le virus complet et infectieux, il est possible que ces systèmes soient sensibles à l'ARN interférence mais que le virus infectieux lui soit résistant. Pour toutes ces raisons, l'efficacité des siRNAs chez le patient est incertaine. Néanmoins, les siRNAs demeurent des outils très utiles pour étudier la réplication du virus et les facteurs cellulaires qui sont impliqués dans son cycle viral.

## **2.5. Aptamères**

En 1990, la structure tridimensionnelle complexe de l'ARN et de l'ADN a été exploitée pour lier des ligands spécifiques (Robertson and Joyce, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990). Les aptamères sont des oligonucléotides capables de lier un ligand spécifique grâce à leur structure tridimensionnelle unique (Mayer and Jenne, 2004). Ils peuvent être synthétisés contre des protéines ou des molécules d'ARN (Figure 4).

### **2.5.1. Mécanisme d'action**

La sélection d'aptamères s'effectue *in vitro* à l'aide d'une librairie aléatoire d'ADN. Les molécules sont sélectionnées selon leur capacité d'interagir avec et d'inhiber une protéine ou un ARN cible (Ellington *et al.*, 1990; Sun, 2000; Bunka *et al.*, 2006).

### **2.5.2. Utilisation contre le VHC**

Plusieurs aptamères ont été synthétisés contre le VHC. Leur capacité de liaison à des protéines spécifiques a été exploitée pour cibler les protéines NS3 (Kumar *et al.*,

1997;Urvil *et al.*, 1997;Vishnuvardhan *et al.*, 1997;Fukuda *et al.*, 2000;Hwang *et al.*, 2000a;Hwang *et al.*, 2000b;Kakiuchi *et al.*, 2003;Nishikawa *et al.*, 2003;Sekiya *et al.*, 2003;Umehara *et al.*, 2004;Fukuda *et al.*, 2004;Hwang *et al.*, 2004;Nishikawa *et al.*, 2004;Umehara *et al.*, 2005) NS5B (Bellocave *et al.*, 2003;Vo *et al.*, 2003;Jones *et al.*, 2006) et la capsid (Lee *et al.*, 2007). L'ARN de la région 5'-RNC a également été ciblé (Kikuchi *et al.*, 2002;daz-Carroll *et al.*, 2002;Kikuchi *et al.*, 2003a;Kikuchi *et al.*, 2003b;Da Rocha *et al.*, 2004;Romero-Lopez *et al.*, 2005;Kikuchi *et al.*, 2005). Ils peuvent donc être utilisés pour inhiber aussi bien l'activité des enzymes que la réplication du VHC.

### **2.5.3. Essais cliniques**

Un aptamère élaboré par la compagnie Eyetech (maintenant OSI Pharmaceuticals, Melville, New York, Etats-Unis) est approuvé par la FDA depuis 2004. Il s'agit de Macugen qui est utilisé pour traiter la dégénérescence maculaire. Plusieurs aptamères sont présentement en essais cliniques, mais aucun d'entre eux n'est utilisé contre le VHC [revue dans (Que-Gewirth and Sullenger, 2007)].

### **2.5.4. Avantages et désavantages**

Les aptamères sont les seuls oligonucléotides capables d'inhiber directement l'activité des protéines. Leur mécanisme d'action est totalement différent de celui des autres molécules oligonucléotidiques. Les aptamères agissent comme des petits peptides ou des anticorps en liant leur cible. Comme ils sont composés d'ADN ou d'ARN, ils sont sensibles aux nucléases et peuvent être modifiés afin d'augmenter leur demi-vie. L'approbation des aptamères contre la dégénérescence maculaire par la FDA permet d'envisager que ces molécules ont un avenir prometteur dans le traitement du VHC. Il faut cependant être prudent car les aptamères ne produisent pas leur inhibition grâce à leur séquence nucléotidique mais plutôt grâce à leur structure tridimensionnelle. De ce



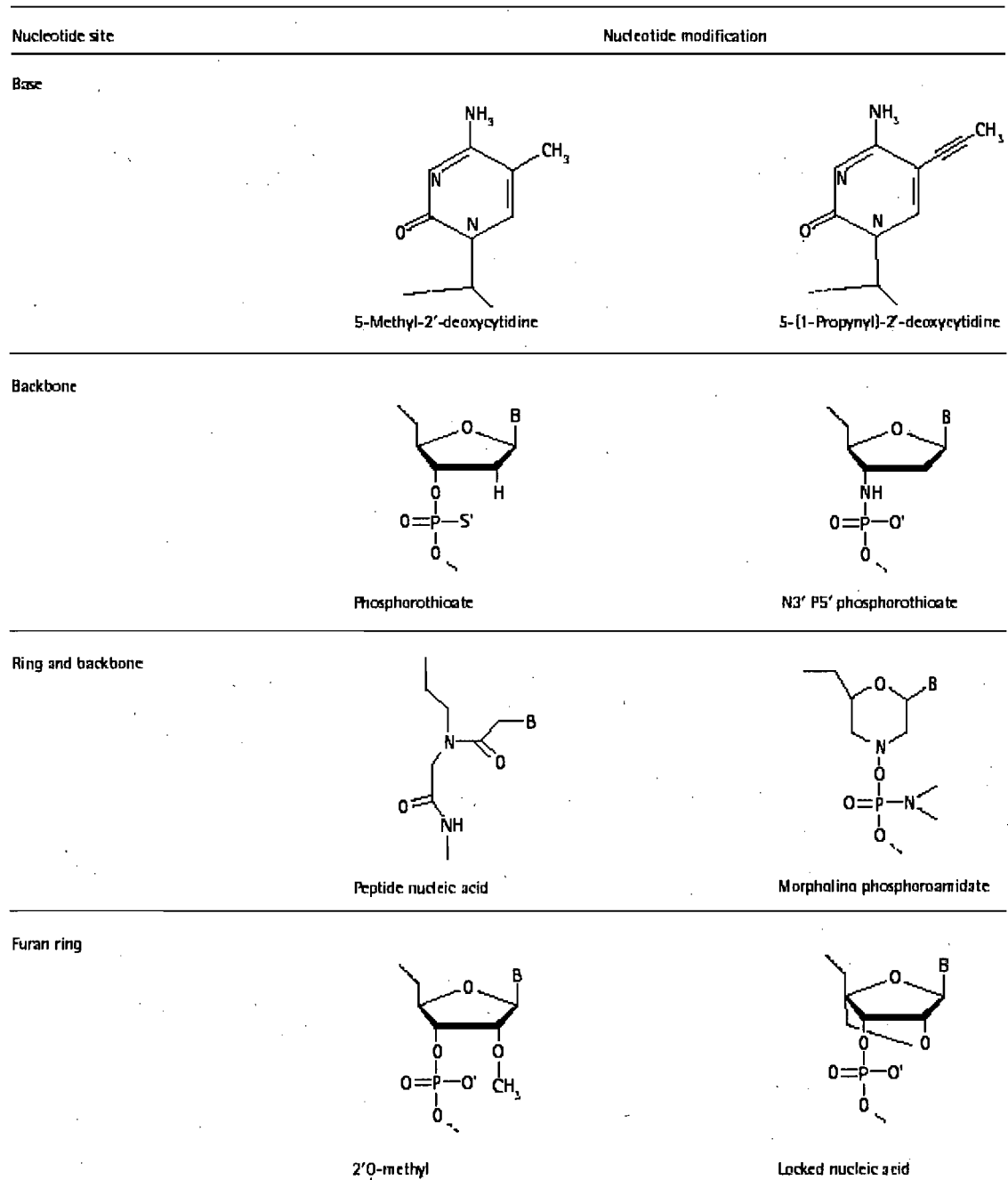
fait, il est possible que les motifs ciblés se retrouvent sur d'autres ARN non ciblés. Ainsi, leur spécificité peut être beaucoup moins grande que l'appariement Watson-Crick utilisé par les autres molécules antisens.

## 2.6. Modifications chimiques des antisens

Il n'est pas conseillé d'injecter directement des oligonucléotides sans modifications dans un patient car ils seront dégradés rapidement par les nucléases extracellulaires. Plusieurs modifications chimiques ont donc été introduites dans leur structure afin d'augmenter leur stabilité. Certaines modifications permettent même d'augmenter leur affinité avec le substrat et de réduire leur toxicité. Les modifications nucléotidiques ont été classées selon l'endroit où la modification est introduite, soit: la base du nucléotide, le groupement phosphate, le ribose ou le ribose et le groupement phosphate (Kurreck, 2003; Gallo *et al.*, 2003). Les modifications les plus courantes sont illustrées à la figure 6.

Les modifications qui ont été introduites dans la base du nucléotide sont peu nombreuses et sont rarement utilisées dans des applications thérapeutiques. Parmi celles-ci on compte les modifications C-5-propyne et les ajouts de méthyles dans les désoxycytidines ou les désoxythymidines (Figure 6). Ces modifications permettent d'augmenter la stabilité de la liaison avec l'ARN cible (Freier and Altmann, 1997). Peu d'études ont évalué leur efficacité, mais des articles discutent de leur potentiel thérapeutique (Herdewijn, 2000).

Deux types de modifications peuvent être effectuées dans le groupement phosphate (Figure 6). La première consiste en la substitution de l'oxygène par un soufre. Cette modification est nommée phosphorothioate. La deuxième modification substitue cet oxygène par un groupement méthyle pour générer un méthylphosphonate. Les



**Figure 6.** Modifications nucléotidiques utilisées couramment en thérapie. Tiré de (Trepanier *et al.*, 2006b).

phosphorothioates sont les modifications les plus utilisées dans les essais cliniques, car cette modification augmente la résistance aux nucléases, la solubilité des oligonucléotides et leur internalisation cellulaire (Zamaratski *et al.*, 2001;Kurreck, 2003). La grande popularité des phosphorothioates vient du fait que ce sont les seules modifications à permettre le recrutement et l'activation de la RNaseH cellulaire pour couper l'ARN cible (Zamaratski *et al.*, 2001). La popularité des phosphorothioates va cependant diminuer au cours des prochaines années car cette modification active le système immunitaire, cause des liaisons non spécifiques avec des protéines sanguines et cellulaires et possède une mauvaise pharmacocinétique (Stein, 1996;Levin, 1999). La toxicité engendrée par les phosphorothioates a conduit à l'élaboration de nouvelles modifications.

Les modifications du ribose les plus fréquentes consistent en l'ajout d'un groupement méthyle ou d'un méthoxyéthoxy en position 2'-OH de l'anneau de furane (Figure 6) (Jason *et al.*, 2004). L'ajout de méthyle, nommé 2'-O-méthyle, modifie la conformation du ribose afin d'augmenter et de stabiliser sa liaison avec l'ARN cible (Gallo *et al.*, 2003). Ces modifications offrent également une bonne résistance aux nucléases (Cummins *et al.*, 1995). De plus, l'ajout d'un groupement méthyle sur le ribose n'est absolument pas toxique car ces molécules se retrouvent naturellement dans les cellules (Ebhardt *et al.*, 2005;Kirino and Mourelatos, 2007). Elles ne permettent toutefois pas le recrutement de la RNase H (Kurreck, 2003). Cet inconvénient peut être évité en utilisant des chimères contenant des oligonucléotides sans modifications et des oligonucléotides modifiés. L'utilisation de chimères permet de générer une molécule qui est résistante aux nucléases, qui active la RNase H, qui est peu toxique et qui possède une grande affinité pour son substrat (Agrawal, 1999).

La position 2' du ribose peut également être modifiée par des LNA (locked nucleic acid) (Figure 6) (Orum and Wengel, 2001;Kurreck, 2003). Les LNA connecte l'oxygène en 2' du ribose au carbone en 4' par un pont de méthylène. Cette modification

confère une bonne résistance aux nucléases, une grande affinité avec l'ARN cible et ne semble pas toxique (Elayadi *et al.*, 2002; Kurreck, 2003). Les LNA ne permettent pas de recruter la RNase H, mais elles peuvent être utilisées sous forme de chimère.

Le remplacement de la chaîne phosphodiester de l'ADN peut permettre d'augmenter la stabilité et la demie-vie de l'oligonucléotide. Les PNA (peptide nucleic acid) sont des analogues d'oligonucléotides dans lesquels la chaîne phosphodiester a été remplacée par une chaîne pseudo-peptidique (Figure 6) (Nielsen *et al.*, 1991). Ces molécules, qui ne sont ni des peptides, ni des acides nucléiques, s'apparient aux polymères d'acides nucléiques en formant des paires de bases classiques. Cette modification confère une bonne résistance aux nucléases et aux protéases (Nielsen, 2000b). L'absence de charge dans leur squelette conduit à la formation de complexes extraordinairement stables avec l'ADN et l'ARN. Cependant, cette absence de charge devient un obstacle important pour l'internalisation de ces molécules dans les cellules (Sazani *et al.*, 2002). Les morpholinos sont d'autres analogues d'oligonucléotides dans lesquels la chaîne phosphodiester a été remplacée par un lien phosphorodiamidate non-ionique et dans lesquels le ribose a été remplacé par un anneau de six morpholines (Summerton and Weller, 1997). Les morpholinos ont une grande affinité pour l'ARN et une bonne résistance aux nucléases, mais ne permettent pas d'activer la RNase H (Summerton *et al.*, 1997; Urban and Noe, 2003). La complexité des étapes de synthèse ne permet pas la construction de chimères pour activer la RNase H. Les morpholinos sont donc utilisés uniquement comme bloqueur stérique. De plus, les morpholinos ont une charge neutre, ce qui rend leur livraison difficile. Cet inconvénient retardera probablement leur entrée en clinique.

En résumé, la structure des oligonucléotides doit être modifiée pour empêcher leur dégradation prématurée par les nucléases dans les liquides biologiques. Les phosphorothioates sont les modifications les plus utilisées, mais elles doivent être remplacées en raison de leur toxicité. La plupart des nouvelles modifications bénéficient

d'une augmentation de leur affinité pour l'ARN, d'une meilleure résistance aux nucléases et d'une meilleure biodisponibilité. Parmi celles-ci, les modifications 2'-O-méthyle et les LNA sont très prometteuses. Une étude comparant ces deux modifications a conclu que les 2'-O-méthyles sont plus efficaces et possèdent une meilleure résistance aux nucléases que les LNA (Schubert *et al.*, 2003). De plus, les modifications 2'-O-méthyles n'engendrent pas de toxicité car elles sont naturellement retrouvées dans plusieurs sortes d'ARN cellulaires. Finalement, la nature atypique du squelette des PNA et des morpholinos leur confère de nombreux avantages, mais leur neutralité entrave énormément leur utilisation thérapeutique. Il est très important d'évaluer les avantages et les inconvénients de chaque modification selon l'utilisation qu'on souhaite en faire.

## 2.7. Livraison

La livraison des antisens dans les cellules cibles demeure le plus grand défi à relever. Les oligonucléotides sont internalisés naturellement dans les cellules par endocytose (Yakubov *et al.*, 1989). L'efficacité de l'internalisation dépend du type cellulaire et de la structure chimique de la molécule. Il est possible d'augmenter la livraison des oligonucléotides en utilisant des méthodes physiques, électriques ou chimiques.

Les méthodes physiques et électriques comprennent l'électroporation, l'application de pression, d'ultrasons ou d'ondes de chocs [revue dans (Lysik and Wu-Pong, 2003;Patil *et al.*, 2005)]. Ces méthodes sont efficaces en culture cellulaire mais s'avèrent peu pratique chez l'humain.

La livraison des oligonucléotides peut également être facilitée par l'utilisation de vecteurs viraux ou de liposomes. Les vecteurs viraux offrent la possibilité de cibler une variété impressionnante de cellules humaines. Leur utilisation est toutefois controversée car ils peuvent engendrer plusieurs complications dont l'activation du système

immunitaire (Flotte and Laube, 2001; Raper *et al.*, 2003). De plus, l'intégration aléatoire du génome viral peut causer des mutations importantes dans le génome humain.

Les liposomes sont des vésicules contenant un milieu aqueux entouré d'une couche phospholipidique. Les liposomes sont très versatiles car ils permettent aussi bien de transporter les drogues hydrophiles que les drogues hydrophobes. Les oligonucléotides peuvent donc être incorporés dans ces molécules pour les protéger des nucléases jusqu'à leur entrée dans la cellule. Les liposomes ne sont que peu ou pas immunogènes car ils ne contiennent pas de protéines (Patil *et al.*, 2005).

L'utilisation de véhicules est nécessaire en culture cellulaire mais ne semble pas requise dans le corps humain (Lyngstadaas *et al.*, 1995). Il est toutefois préférable que l'oligonucléotide se distribue principalement dans l'organe ciblé afin de réduire au maximum la quantité de drogue requise. Dans le cas du traitement de l'hépatite C, les antisens peuvent être administrés dans le foie facilement par injection intraveineuse (Richardso *et al.*, 2002). Dans le foie, 80% des oligonucléotides s'accumulent dans les cellules non-parenchymateuses, ce qui signifie que peu d'oligonucléotides se retrouvent dans les hépatocytes (Juliano *et al.*, 1999; Opalinska *et al.*, 2006). Il est donc nécessaire d'augmenter la quantité d'oligonucléotides dans le foie ou d'utiliser un vecteur qui permet d'augmenter l'apport aux hépatocytes.

## **2.8. Toxicité et immunogénicité potentielle des oligonucléotides**

L'utilisation d'oligonucléotides peut générer une toxicité due à une hybridation non spécifique de la séquence ou par un mécanisme indépendant de l'hybridation. Il est possible qu'une molécule antisens s'associe à un ARNm non visé, mais cette probabilité est relativement faible car l'affinité des antisens pour leur cible diminue si la séquence n'est pas identique. La spécificité d'une molécule antisens est proportionnelle au nombre de nucléotides qu'elle contient. La plupart des molécules ont donc une longueur d'au moins 20 nucléotides, ce qui confère une spécificité relativement grande (Levin, 1999).

Il est important de noter que si une hybridation non spécifique survient, elle n'engendra pas nécessairement une toxicité. Pour qu'une hybridation non spécifique soit toxique il faut que : 1) la séquence soit exprimée, 2) le site d'hybridation soit accessible, 3) l'appariement entre l'antisens et l'ARN soit quasi-parfaite, et également que 4) la réduction de l'expression du gène entrave le fonctionnement normal de l'organisme ou de la cellule. L'ensemble de ces facteurs implique qu'il soit peu probable que les antisens engendrent une toxicité due à une hybridation non-spécifique. D'autant plus qu'il est relativement facile de prévenir ce genre de toxicité en vérifiant dans des banques de données que la séquence choisie ne s'hybride pas à des gènes humains. Un microarray peut aussi être effectué afin de s'assurer que l'expression des gènes cellulaires normaux n'est pas affectée.

Les séquences nucléotidiques contenues dans les molécules antisens peuvent également induire une réponse immunitaire. Il a été démontré que l'ADN bactérien et certains oligonucléotides synthétiques peuvent stimuler les cellules mononucléées et les lymphocytes *in vitro* et *in vivo*, ce qui résulte en la sécrétion d'interleukine-6, d'interleukine-12, d'interféron et d'IgM (Krieg, 2002). Cette réponse immunitaire a été associée à des séquences spécifiques, notamment les motifs CpG. Les motifs CpG sont constitués des résidus CG localisés entre deux purines à la partie 5' et deux pyrimidines en 3' (exemple : AACGTT) (Levin, 1999). Il est cependant simple de choisir des molécules antisens qui ne contiennent pas ces séquences. Il faut également éviter d'utiliser des antisens qui contiennent des quartets de guanine, car ils peuvent se lier à des protéines ou de l'ARN de façon non-spécifique (Williamson, 1993). Hormis la séquence nucléotidique, les antisens peuvent engendrer une toxicité par les modifications chimiques qui leur ont été ajoutées ou les vecteurs utilisés pour leur transport. Par exemple, les modifications phosphorothioates peuvent activer les cellules NK et les neutrophiles (Ballas *et al.*, 1996; Itou *et al.*, 2005). Il a également été démontré que l'utilisation de polyéthylène glycol dans les liposomes pouvait générer une réponse

immunitaire chez la souris (Semple *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données souligne l'importance d'effectuer des études toxicologiques pour chaque molécule.

## 2.9. Meilleure application antisens contre le VHC

Le virus de l'hépatite C est un pathogène humain important. Aucun vaccin n'est disponible pour prévenir l'infection et le traitement disponible est efficace chez seulement la moitié des patients. Les thérapies alternatives envisagées consistent surtout en l'utilisation d'inhibiteurs de protéines virales. Malheureusement, l'efficacité de ces inhibiteurs protéiques peut être facilement compromise par les mutations virales. De plus, ces inhibiteurs ne permettent pas d'éliminer le génome viral des cellules.

Le VHC possède un génome composé d'ARN simple brin à sens positif. L'ARN génomique code directement pour les protéines virales et il se réplique par l'intermédiaire d'un ARN à sens négatif. La destruction de l'ARN génomique permettrait donc d'enrayer la synthèse protéique et la réplication virale. Les seules molécules capables de détruire directement cet ARN génomique sont les ON-AS qui activent la RNase H, les Rz, les Dz et les siRNAs. Voici une comparaison du potentiel thérapeutique de chacune de ces molécules contre le VHC.

Les ON-AS qui activent la RNase H sont composés d'oligonucléotides non modifiés ou d'oligonucléotides modifiés aux phosphorothioate. Les molécules non modifiées sont dégradées trop rapidement dans les liquides biologiques pour être utilisées comme thérapie. Les molécules de phosphorothioates sont également déconseillées car elles peuvent être très toxiques (Lebedeva and Stein, 2001). L'utilisation d'ON-AS n'est donc pas des plus approprié. De plus, la RNase H peut difficilement dégrader l'ARN cytoplasmique du VHC car cet enzyme est localisé principalement dans le noyau cellulaire (Büsen and Frank, 1998).



La composition en ARN des Rz et des siRNA rend leur synthèse plus dispendieuse que celle des molécules à ADN. Les molécules d'ARN sont dégradées plus rapidement et ont donc une demi-vie beaucoup plus courte. Les Rz sont généralement moins efficaces que les Dz et les siRNAs (Goila *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 1999; Kurreck *et al.*, 2002; Beale *et al.*, 2003).

L'utilisation des siRNAs dans le traitement du VHC présente également quelques problèmes. Les siRNA possédant une trop grande spécificité sont beaucoup plus susceptibles aux mutations dans le génome viral que les autres molécules antisens. À l'inverse, l'inhibition non spécifique causée par certains siRNA due à un manque de spécificité peut avoir des effets secondaires désastreux. De plus, le VHC semble pouvoir bloquer l'ARN interférence en interagissant avec ses molécules clés. Par exemple, sa capsidie lie et inactive l'enzyme Dicer et sa protéine NS5B interagit avec la protéine Argonaute du complexe RISC afin d'augmenter la réplication virale (Wilson and Richardson C, 2005b; Wang *et al.*, 2006; Randall *et al.*, 2006b). Il est donc périlleux d'utiliser cette technologie contre un virus qui possède une panoplie de moyens pour la contourner.

Les désoxyribozymes semblent les meilleurs candidats pour abolir l'ARN du VHC car ils possèdent une bonne activité catalytique, une bonne résistance aux nucléases, une bonne spécificité et qu'ils sont faciles à synthétiser. Ces nombreux avantages ont été utilisés contre plusieurs virus, dont: le VIH-1 (Dash *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999c; Sriram and Banerjea, 2000; Basu *et al.*, 2000; Unwalla and Banerjea, 2001a; Unwalla and Banerjea, 2001b; Chakraborti and Banerjea, 2003a; Chakraborti and Banerjea, 2003b; Dash and Banerjea, 2004; Unwalla *et al.*, 2006; Sood *et al.*, 2007; Jakobsen *et al.*, 2007), l'hépatite B (Wo *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2005; Wo *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2006a; Hou *et al.*, 2006b), le VHC (Oketani *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002b; Yu *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2005; Vlassova *et al.*, 2006; Trepanier *et al.*, 2006a), le virus respiratoire syncytial (Zhao *et al.*, 2003; Xie *et al.*,

2006), le virus de l'influenza A (Takahashi *et al.*, 2000; Toyoda *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2004), le virus du papillome humain (Clawson *et al.*, 2004), le rhinovirus 14 (Schubert *et al.*, 2003), le virus Epstein Barr (Lu *et al.*, 2005), et le virus de l'encéphalite Japonaise (Appaiahgari and Vрати, 2007). Les résultats obtenus sont très encourageants, ce qui nous a incité à dessiner des désoxyribozymes contre l'ARN du VHC afin de couper son génome et d'abolir sa réplication.

L'utilisation d'oligonucléotides contre le VHC semble une bonne alternative thérapeutique. Parmi ces molécules, les désoxyribozymes s'avèrent les plus appropriés pour détruire l'ARN viral. La fonction des protéines virales peut également être bloquée efficacement par les aptamères. Ces molécules peuvent être modifiées pour augmenter leur demi-vie et leur efficacité. De plus, l'utilisation de vecteurs peut augmenter leur efficacité en les acheminant directement à l'organe ciblé.

### 3. Objectifs du projet de thèse

L'objectif global du projet de recherche est d'identifier un ou plusieurs désoxyribozymes contre des régions conservées du génome de l'hépatite C. L'efficacité de coupure sera d'abord évaluée dans un système biochimique *in vitro*, ensuite *ex vivo*, dans les lignées cellulaires contenant l'ARN viral et finalement *in vivo* dans un modèle de souris xéno greffées.

La région encodant la capsid virale a été choisie comme cible en raison de sa grande conservation nucléotidique. Le repliement de l'ARN viral a été analysé avec le programme informatique Mfold afin d'identifier des régions simple brin comme sites de liaison potentiels pour les désoxyribozymes. Des désoxyribozymes ont été synthétisés contre ces régions. Les désoxyribozymes ont été synthétisés avec différentes longueurs de bras de liaison et différentes modifications afin d'obtenir des molécules avec un maximum d'efficacité.

L'efficacité de coupure des désoxyribozymes a d'abord été évaluée dans un système biochimique à l'aide d'ARN marqué au  $^{32}\text{P}$ . Les molécules les plus efficaces ont ensuite été évaluées dans des lignées cellulaires exprimant une portion du génome du VHC. Ces molécules ont également été évaluées dans un nouveau système de culture cellulaire contenant le génome complet et fonctionnel du VHC. La biodistribution et la toxicité des désoxyribozymes seront également évaluées dans des souris. Finalement, notre meilleur candidat sera évalué *in vivo* dans des souris xéno greffées et ultimement dans des essais cliniques chez des patients infectés.

## 4. Résumé des articles

Les articles suivants contiennent les principaux résultats obtenus lors de mon doctorat. Le premier article démontre l'efficacité de coupure de trois désoxyribozymes dirigés contre la région de la capsid du VHC. Ces trois désoxyribozymes ont été modifiés aux phosphorothioates et leur efficacité a d'abord été comparée dans un système biochimique contenant l'ARN viral marquée au  $^{32}\text{P}$ . Cet article a permis d'identifier notre meilleur candidat, Dz858, et démontre son potentiel dans deux lignées cellulaires différentes.

Le deuxième article démontre que le remplacement des phosphorothioates par des groupements méthyles améliore grandement l'efficacité de Dz858. De plus, il présente les détails de notre système de production d'un ARN viral pleine longueur de génotype 1b qui permet la production de protéines virales. Ce nouveau système a permis d'évaluer le potentiel réel de Dz858 contre un ARN viral complet et fonctionnel. Une quantité aussi faible que 23,4 nM a été suffisante pour que notre nouveau désoxyribozyme, Dz858-4-OMe, réduise cet ARN viral de 63%. De plus, cet article démontre que Dz858-4-OMe est nettement supérieur à un autre désoxyribozyme reconnu pour son efficacité contre l'ARN du VHC. Cet article est actuellement soumis à *Virology*.

Un troisième article de revue sur le potentiel thérapeutique des molécules antisens contre le VHC a été mis en annexe. Il contient plusieurs éléments complémentaires à cette thèse.

J'ai contribué à environ 70% de l'effort collectif de ces publications en effectuant la quasi-totalité des expériences présentées, en participant à l'élaboration des stratégies expérimentales et en écrivant la version brute des articles.

## Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes

J. Trepanier,<sup>1</sup> J. E. Tanner,<sup>1</sup> R. L. Momparler,<sup>2</sup> O. N. L. Le,<sup>1</sup> F. Alvarez<sup>3</sup> and C. Alfieri<sup>1</sup> Departments of <sup>1</sup>Microbiology; <sup>2</sup>Pharmacology; and <sup>3</sup>Pediatrics, Sainte-Justine Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Received August 2004; accepted for publication December 2004

**SUMMARY.** Hepatitis C virus (HCV) infection represents an important global health problem. Current antiviral therapeutics for HCV have proven inadequate in stemming the disease process. A novel therapeutic strategy involves the use of deoxyribozymes, also known as DNA enzymes or DNAzymes. These catalytic DNA molecules, designed to target and cleave specific RNA sequences, have shown promise in *in vitro* experimental models for various diseases and may serve as an alternative or adjunct to current HCV drug therapy. We designed and tested several deoxyribozymes that can bind and cleave highly conserved RNA sequences encoding the HCV core protein in *in vitro* systems.

One of these deoxyribozymes reduced the level of our HCV RNA target by 32% and 48% after 24 h of cell exposure when tested in human hepatoma and epithelial cell lines, respectively. As this deoxyribozyme showed significant cleavage activity against HCV core protein target RNA in human cells, it may have potential as a therapeutic candidate for clinical trial in HCV infected patients.

**Keywords:** antiviral, core protein, deoxyribozyme, DNAzyme, HCV.

### INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease, a condition which, if left untreated, can eventually lead to hepatocellular carcinoma or outright liver failure [1]. Current HCV therapy for acute and chronic HCV infection consists of a combination of interferon- $\alpha$  and the nucleoside analogue, ribavirin [2]. In spite of the encouraging results obtained with this combination therapy, over 50% of treated patients will not achieve a stable virus load or virus clearance [3]. While various therapeutic stratagems for HCV are undergoing clinical testing and include drugs which inhibit virus protein processing or virus RNA replication [3,4], many of these agents will likely lose therapeutic effectiveness because of HCV's high rate of mutation and ensuing drug resistance [5]. Thus the development of alter-

native HCV therapeutics will remain a pressing issue for the foreseeable future [6].

One strategy currently under intense investigation is concerned with attempts to cleave HCV genomic RNA with either ribozymes or deoxyribozymes [7,8]. RNAzymes, also referred to as ribozymes, were originally discovered in plants as self-cleaving motifs encoded within the genome of a number of small, circular pathogenic RNA viruses [9]. Subsequently, RNAzymes have been genetically modified to recognize and cut aberrant cellular mRNAs or the RNA genomes of certain human viruses [8,10]. Unfortunately RNAzymes suffer the disadvantages of a short half-life because of biological instability, difficulty in large-scale synthesis and a possible loss in biologic activity when encountering RNAs with alternative base substitutions [11]. Deoxyribozymes, by contrast, represent a more desirable HCV drug candidate because of their small size (30–40 bases), ease of synthesis, and increased resistance to chemical or nuclease degradation [12]. Additionally, deoxyribozymes are enzymatically more efficient compared with RNAzymes, display greater target specificity and appear less demanding in their RNA target requirements [13,14].

Deoxyribozymes were originally generated through a combination of chemical synthesis and high-throughput selection [15]. Deoxyribozymes are classified as type I or type II based on their catalytic domain nucleotide structure and

Abbreviations: Dz, deoxyribozyme; HCV, hepatitis C virus; mtDz, mutant deoxyribozyme; nt, nucleotide; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; UTR, untranslated region.

Correspondence: Caroline Alfieri PhD, Sainte-Justine Hospital Research Centre, 3175 Côte Sainte-Catherine Road, Montreal (QC), Canada H3T 1C5. E-mail: [REDACTED]

their RNA target recognition sequence [15]. Type I deoxyribozymes contain a 13-base catalytic domain and cleave AA/G motifs, whereas type II deoxyribozymes have a catalytic domain nucleotide length of 15 bases and cleave AC/U or GC/U motifs. Deoxyribozymes are currently in development for the treatment of cancer [16], genetic diseases [17] and the management of several viral infections, including HIV, hepatitis B and influenza [7,18–20].

In an attempt to develop new HCV therapeutics, we designed and characterized three deoxyribozymes that recognized and efficiently cleaved a highly conserved HCV genome sequence encoding the viral core protein.

## MATERIALS AND METHODS

### Deoxyribozyme design and construction

The HCV type 1 genomic segment encompassing the contiguous 5'-untranslated region (UTR) and core protein coding sequence (contained within pGEM-7Zf-HCV) was kindly provided by Dr S. Mounir, (Shire Pharmaceuticals, Laval, QC, Canada) [21]. The sequence was surveyed using the m-fold computer program (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>) to identify single-stranded loops within this HCV segment having deoxyribozyme cleavage potential [22,23]. Type II deoxyribozymes used in the present study and listed in Table 1 were synthesized using phosphoramidite chemistry (Alpha DNA Ltd., Montreal, QC, Canada and Biosource International, Camarillo, CA, USA) and high-pressure liquid chromatography. To compare the effect of deoxyribozyme arm length on cleavage efficiency, deoxyribozymes of varying arm lengths were also synthesized. The 3' recognition arm was fixed to a length of 15 nucleotides and the 5' recognition arm was varied to either nine or 15 nucleotides [24]. Mutant deoxyribozymes (mtDz) unable to cleave HCV RNA targets were generated by substituting a guanine for a thymidine residue at position 4 of the catalytic domain [7].

### Synthesis of the deoxyribozyme RNA substrate

To generate sufficient HCV RNA target substrate the cDNA sequence from pGEM-7Zf-HCV spanning the HCV 5'UTR and the adjoining core protein coding sequence (HCV genome positions 1–976) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the sense primer 5'-TGTAATACGACTCACTATAGCGA-3' encoding the bacteriophage T7 RNA polymerase promoter and an anti-sense HCV-encoding primer 5'-TCATACACAATGCITGCGTTG-3'. Amplified DNA was fractionated by agarose gel electrophoresis and purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). Radiolabelled RNA substrate was generated as recommended by the manufacturers using 1 µg amplified HCV cDNA, the MegaScript T7 transcription kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA), T7 RNA polymerase (Ambion Inc.) and [<sup>32</sup>P]UTP (20 mCi/mL, 800 Ci/mmol) (Amersham, Piscataway, NJ, USA). Transcription reactions were performed at 37 °C for 6 h followed by DNA template removal using RNase-free DNase (Ambion Inc.), phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation.

### $K_m$ and $K_{cat}$ and time course determinations

The  $K_m$  and  $K_{cat}$  values for deoxyribozymes were determined using the Michaelis–Menten enzyme equation  $Y = (V_{max} \times X) / (K_m + X)$  and the equation  $K_{cat} = V_{max} / S_i$ , respectively, where the  $V_{max}$  was obtained empirically,  $Y$  represents the per cent cleavage,  $X$  represents the deoxyribozyme concentration and  $S_i$  represents the original substrate concentration of 100 nM (Prism 3.03 software, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A total amount of 100 nM radiolabelled HCV RNA substrate was suspended in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and incubated for 1 h at 37 °C with increasing log<sub>10</sub> concentrations of deoxyribozyme ranging in value from 10 nM to 100 µM. Cleavage reactions were terminated by the addition of gel

Table 1 Deoxyribozyme sequences

	5' recognition binding arm	Catalytic domain	3' recognition binding arm	HCV RNA target
Dz348-9-15	TCTTTGAGG	GGCTAGCT <b>ACA</b> ACGA	TTAGGATTCG <b>T</b> GCCTC	GAGCACGAAUCCUAAA/ CCUCAAGA
mtDz348-9-15	TCTTTGAGG	GGCGAGCT <b>ACA</b> ACGA	TTAGGATTCG <b>T</b> GCCTC	AAUUGGGUAAGGUCA/ UCGAUACC
Dz699-9-15	GGGTATCGA	GGCTAGCT <b>ACA</b> ACGA	GACCTTACCCAAATT	AAUUGGGUAAGGUCA/ UCGAUACC
mtDz699-9-15	GGGTATCGA	GGCGAGCT <b>ACA</b> ACGA	GACCTTACCCAAATT	UCGAUACC
Dz858-9-15	AGAGGAAGA	GGCTAGCT <b>ACA</b> ACGA	AGAAAAAGAGCAACC	GGUUGCUCUUUUUCUA/ UCUUCUCU
mtDz858-9-15	AGAGGAAGA	GGCGAGCT <b>ACA</b> ACGA	AGAAAAAGAGCAACC	UCUUCUCU
Dz858-15-15	GAGCCAAGAGGAAGA	GGCTAGCT <b>ACA</b> ACGA	AGAAAAAGAGCAACC	GGUUGCUCUUUUUCUA/ UCUUCUCUUGGCUC
mtDz858-15-15	GAGCCAAGAGGAAGA	GGCGAGCT <b>ACA</b> ACGA	AGAAAAAGAGCAACC	UCUUCUCUUGGCUC

Dz, deoxyribozyme; A/, predicted Dz cleavage site.

Boldface letters indicate phosphorothioate linkage; underlined letters indicate T → G substitution.

loading buffer containing 95% formamide, and RNA cleavage products resolved by gel electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel containing 8 M urea and Tris-borate buffer [25]. Following electrophoresis, gels were dried and cleavage products quantified using the SI PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Relative band intensity for the cleavage products was plotted as the percentage of cleaved RNA vs the deoxyribozyme concentration.

An amount of 100 nM radiolabelled HCV RNA substrate was also incubated at 37 °C with 1 µM deoxyribozyme in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and 10 mM MgCl<sub>2</sub> for 0–90 min. Reactions were stopped by the addition of gel loading buffer and cleavage products resolved by gel electrophoresis for band quantification as described above. The percentage of cleavage product vs time was then plotted.

#### *Analysis of the intracellular cleavage of HCV RNA*

The HCV eukaryotic expression plasmid, pHCV-UTR-core, encoding a 942 base RNA segment of the HCV UTR and core protein coding sequence (HCV genome position 38–980) was constructed by PCR amplification of pGEM-7Zf-HCV plasmid using the sense primer 5'-cccaagcttggTGAG-GAACTACTGTCTTC-3' and the antisense primer 5'-ttaageggccgcaaatacTGCTCATAACACA-3' primer. Amplified DNA was purified by agarose gel fractionation and QIAquick gel extraction kit (Qiagen Inc.), followed by Hind III and Not I restriction enzyme digestion and insertion into the multicloning site of the eukaryotic expression vector, pcDNA3.1 (+) (Invitrogen Inc., Burlington, ON, Canada).

The human hepatoma cell line HuH-7, kindly provided by Dr Tatsuo Takahashi (Health Science Research Resources Bank, Japan) was cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (MediCorp Inc., Montreal, QC, Canada). The human embryonic kidney cell line 293rtTA was kindly provided by Dr Bernard Massie (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada) and cultured in DMEM medium supplemented with 10% tetracycline-free FBS (Cloneteck, Palo Alto, CA, USA). Both cell lines typically exhibited transfection efficiencies of 50–60% when tested with the green fluorescent protein expression plasmid, pCMV:GreenLantern (Invitrogen Inc, and JF data not shown).

The 293rtTA cells seeded at  $8.5 \times 10^5$  cells per well or HuH-7 cells seeded at  $4 \times 10^5$  cells per well in 6-well plates were cultured overnight and co-transfected with pHCV-UTR-core and deoxyribozyme at a DNA to deoxyribozyme molar ratio of 1:1000 using 3 µl of Lipofectamine 2000 per 1 µg of total DNA (Invitrogen Inc.). In order to equalize HCV plasmid DNA concentration between transfection experiments, final plasmid DNA concentrations were adjusted to 2.5 µg using vector DNA. After 6 h, cells were placed in complete medium and cultured for an additional 18 h. Total cellular RNA was then extracted with Oligotex direct mRNA

extraction kit (Qiagen Inc.) and treated with DNase for 3 h to remove transfected plasmid DNA (Ambion Inc.).

The degree of HCV RNA cleavage was determined by quantitative RT-PCR using sense primer 5'-AAGGCCTTGTTGGTACTGCCGTGATA-3', 6'-carboxyfluorescein, succinimidyl ester (FAM)-labelled probe, 5'-ACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA-3' and antisense primer 5'-GGCGGTTGGTGTACGTTTGGTTT-3'. The DNA signal generated from HCV RNA target was normalized to the neomycin resistance cDNA gene generated from the open reading frame found within our eukaryotic expression plasmid, pHCV-UTR-core. The neomycin resistance gene cDNA was quantified using sense primer 5'-ACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTAT-3', 6'-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein, succinimidyl ester (HEX)-labelled probe 5'-AATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT-3' and antisense primer 5'-CGA'TGTTTCGCTTGGTGGTGAAT-3'. Primers and probes were designed and synthesized by Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, IA, USA). Primers and probes were used at final concentrations of 400 and 200 nM for the amplification of HCV and neomycin resistance gene cDNAs, respectively. cDNAs were initially suspended in Brilliant Multiplex QPCR master mix containing carboxy-x-rhodamine succinimidyl ester (ROX) reference dye (Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA), followed by heating for 10 min at 95 °C, and 45 amplification cycles. Each amplification cycle consisted of a 15 s incubation at 95 °C and a 1 min annealing and elongation step at 60 °C. cDNAs were amplified and quantified using the Mx3000P real-time PCR thermocycler (Stratagene Inc.). Logarithmic concentrations of pHCV-UTR-core plasmid ranging from 1 pg to 10 ng served as reference standards for both the HCV and neomycin resistance gene cDNAs.

#### *Computer analysis*

Selection of deoxyribozyme annealing arms was performed using Vector NTI 8.0 software (Informax, Frederick, MD, USA) [26,27]. Mann-Whitney Rank Sum Test was performed using Sigma Stat 3.0 statistical software package for Windows (Aspire Software International, Leesburg, VA, USA).

## RESULTS

#### *Deoxyribozyme design*

As deoxyribozymes have been shown to cleave HIV-1 viral RNA *in vitro* and *in vivo* [18,28,29], we chose to design HCV antivirals based upon the deoxyribozyme format. Initially, we designed deoxyribozymes that targeted highly conserved RNA sequences contained within the HCV core protein coding region to lessen the likelihood that our deoxyribozyme candidates would eventually be found ineffective against *de novo* HCVs undergoing continuous mutagenesis

[30]. Using the m-fold program to predict HCV core RNA secondary structures and potential sites for deoxyribozyme hybridization and cleavage [31,32], we designed and synthesized three sets of type II deoxyribozymes having asymmetric arms and phosphorothioate linkages incorporated at the flanking end of the two recognition arms (see Table 1; Fig. 1). Arm asymmetry and incorporation of phosphorothioate linkages were expected to enhance deoxyribozyme catalysis and to increase their half-life [33,34]. Deoxyribozymes were designed to recognize HCV RNA at positions 335–359 (Dz348), 684–708 (Dz699) and 843–873 (Dz858). We also synthesized identical deoxyribozyme sets but with ablated catalytic sites to serve as negative controls. Mutated deoxyribozyme (mtDz) constructs were expected to allow us to distinguish noncleavage-specific activity when comparing overall decreases in HCV RNA signal [24].

#### Enzymatic analysis of deoxyribozymes

*In vitro* cleavage was performed using a radiolabelled synthetic HCV RNA produced *in vitro* using pGEM-7Zf-HCV DNA template and T7 RNA polymerase. The RNA substrate spanned HCV UTR-core genomic position 1–976. As shown in a representative urea-polyacrylamide gel illustrating deoxyribozyme cleavage activity for our deoxyribozyme series and for the mutated deoxyribozyme, mtDz858-9-15 (Fig. 2), we observed cleavage of HCV RNA by Dz348 into two fragments of 348 and 628 nucleotides. Dz699 cleaved HCV RNA into fragments of 699 and 277 nucleotides, while Dz858 gave fragments of 858 and 118 nucleotides. Based on predicted cleavage sites within the 976-base HCV RNA

substrate, all three deoxyribozymes properly cut their HCV substrates into appropriate fragment lengths. Conversely, incubation of the HCV RNA substrate with mtDz858-9-15 using a substrate to enzyme (S:E) ratio up to 1:1000 resulted in no detectable cleavage activity (Fig. 2, lane mtDz858-9-15). Similarly, mtDz348-9-15 and mtDz699-9-15 also failed to display significant cleavage activity when assayed with the HCV RNA substrate (S:E ratio of 1:1000, data not shown).

Oketani *et al.* [7] and Cairns *et al.* [24] each reported that increasing deoxyribozyme arm length up to 15 nucleotides seemed to augment deoxyribozyme catalytic efficiency. However, while increasing arm length may increase deoxyribozyme arm affinity, thereby decreasing  $K_m$  and augmenting the percent cleavage, this longer arm length may also affect the ability of the deoxyribozyme to release from its target thus lowering overall catalytic activity or  $K_{cat}$  [15]. We investigated whether increasing the arm length of our more active deoxyribozyme, namely Dz858-9-15, from nine to 15 residues would decrease  $K_m$  without compromising overall catalytic efficiency. Cleavage studies ( $n = 3$ ) similar to those illustrated in Fig. 2 revealed that lengthening the arm of Dz858-9-15 by six nucleotides (Dz858-15-15) resulted in the highest cleavage efficiency (Fig. 3a; Table 2). Dz858-15-15 cleaved HCV RNA more efficiently than did Dz858-9-15, which in turn cleaved HCV RNA more efficiently than Dz699-9-15. Dz348-9-15 failed to exhibit significant cleavage activity above background levels (Fig. 3a). At the initial  $V_{max}$  plateau (i.e. S:E ratio of 1:100), we observed that Dz858-15-15 cut HCV RNA substrate 2.5-, 5.7- and 14-fold greater than Dz858-9-15, Dz699-9-15 and

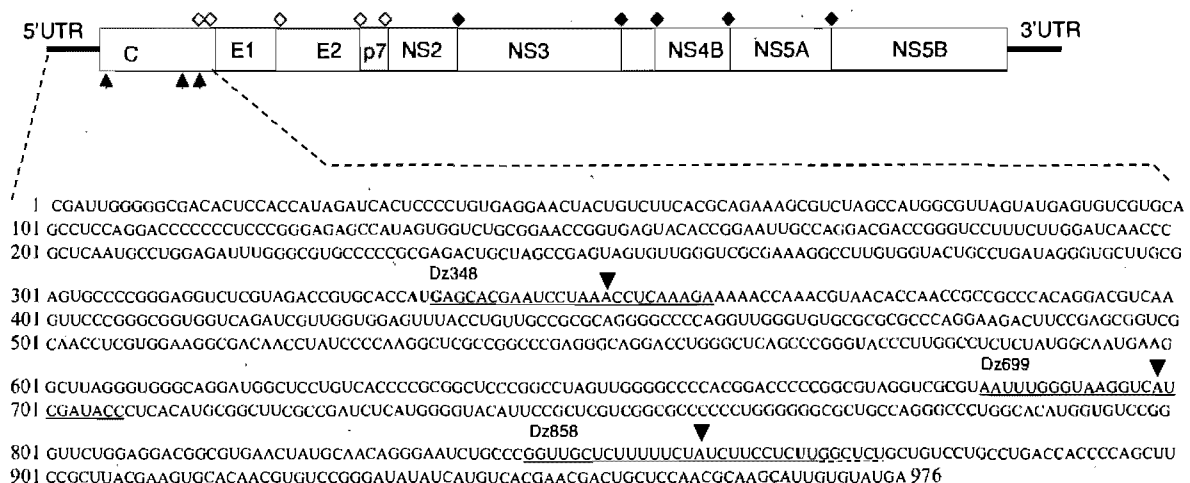
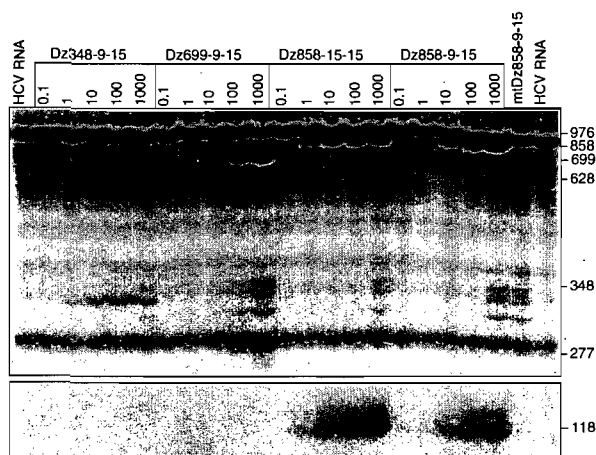


Fig. 1 Schematic map of the HCV RNA genome and deoxyribozyme recognition sites. Coding regions for structural (open rectangles) and nonstructural (NS) (gray rectangles) viral proteins along with protein cleavage sites by cellular signal peptidases (open diamonds), virally encoded proteases (closed diamonds) and predicted deoxyribozyme recognition sites within the core (C) open reading frame (arrow) are shown (Top). Nucleotide sequence 1–976 from HCV type 1b [21] encoding the 5'UTR and the virus core protein (bottom). The AUG initiation codon for the HCV polyprotein is shown in bold. Deoxyribozyme recognition sites are underlined. The six-nucleotide extension for the 5' arm of Dz858-15-15 is shown by the dashed underline. The predicted deoxyribozyme cleavage site is indicated for each deoxyribozyme by the solid triangles.





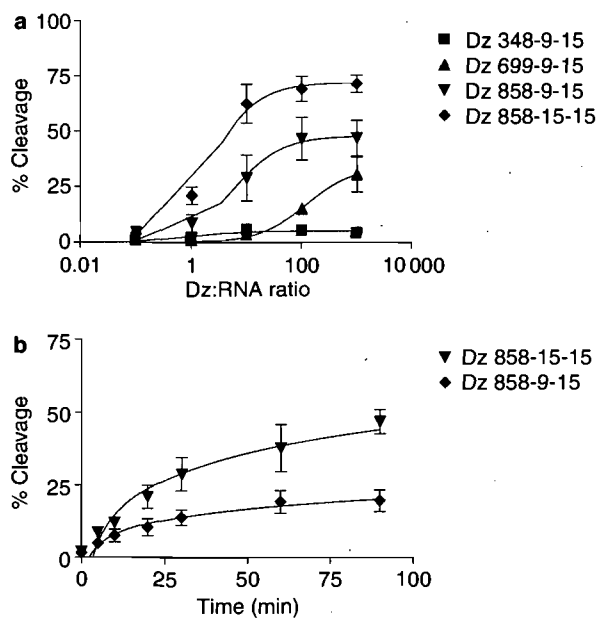
**Fig. 2** *In vitro* cleavage of HCV RNA spanning HCV UTR-core genomic position 1–976 by Dz348-9-15, Dz699-9-15, Dz858-15-15, Dz858-9-15 and mtDz858-9-15. Reactions were performed at 37°C for 1 h as detailed in Materials and methods. Deoxyribozyme to HCV RNA (100 nM) ratios ranged from 0.1 to 1000. Full-length HCV RNA (HCV RNA) or HCV RNA cleavage products produced after Dz348 (628 and 348 nucleotides, nt), Dz699 (699 and 277 nt), Dz858 (858 and 118 nt) treatment are indicated. Uncut HCV RNA following mtDz858-9-15 treatment (S:E ratio of 1:1000) is noted, gel top right.

Dz348-9-15, respectively (Fig. 3a). As shown in Fig. 3a; Table 2, addition of six nucleotides to the 5' arm of Dz858-9-15, decreased  $K_m$  by threefold and increased catalysis by 50% (Table 2). The poor ability of Dz348 to cleave the RNA substrate (Fig. 3a, <5% for all concentrations tested) may be due to a higher preference for type II deoxyribozymes to cleave sequences containing an unpaired purine and a paired pyrimidine residue such as the AU or GU pairs found in Dz858 and Dz699 cleavage sites vs the AC pair found at the Dz348 HCV cleavage site. Another hypothesis for the poor cleavage is the potential masking of the Dz348 cleavage site by HCV RNA secondary structure [15,28].

The increase in Dz858-15-15 enzyme activity vs that for Dz858-9-15 was also apparent when incubation times were varied. The enzymatic activity for Dz858-9-15 was shown to plateau at 60 min, while that for Dz858-15-15 levelled off at 90 min, and Dz858-15-15 achieved a 2.5-fold greater level of cleavage product compared with Dz858-9-15 (Fig. 3b).

#### Intracellular activity of deoxyribozymes

While Dz858-15-15 was capable of recognizing and efficiently cleaving HCV RNA *in vitro*, an earlier report by Oketani *et al.* [7] cautioned that although a given deoxyribozyme would exhibit high  $K_{cat}/K_m$  values *in vitro*, this same molecule might cleave poorly when tested against its target RNA inside living cells. Therefore we tested whether HCV



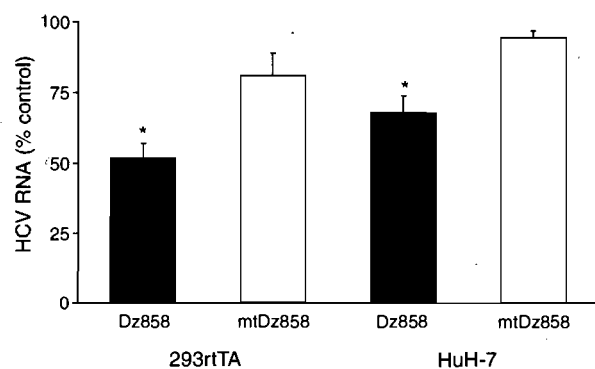
**Fig. 3** Comparison of catalytic activity of the four deoxyribozymes. Effect of different concentrations of deoxyribozymes on *in vitro* cleavage of HCV RNA (a). HCV UTR-core RNA was incubated with increasing molar concentrations of deoxyribozymes. Resulting cleavage products were resolved by gel electrophoresis and quantified by phosphorimaging. Results from three independent experiments were plotted as the percent HCV RNA cleavage  $\pm$  SEM vs deoxyribozyme concentration ratios. Time course of Dz858-9-15 and Dz858-15-15 cleavage of HCV RNA (b). HCV UTR-core RNA (1  $\mu$ g) was incubated with deoxyribozyme (S:E 1:10) at 37 °C for up to 90 min. Resulting cleavage products were resolved by gel electrophoresis and quantified by phosphorimaging. The results from three separate experiments were plotted as the per cent HCV RNA cleavage  $\pm$  SEM vs time.

**Table 2** Deoxyribozyme binding and catalytic constants

Deoxyribozyme	$K_m$ (mol/L)	$K_{cat}$ (per minute)	$K_{cat}/K_m$ [(mol/L)/min]
Dz699-9-15	$1.5 \times 10^{-5}$	$5.9 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^2$
Dz858-9-15	$5.8 \times 10^{-7}$	$8.0 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^4$
Dz858-15-15	$2.1 \times 10^{-7}$	$1.2 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^4$

Dz, deoxyribozyme;  $K_m$ , Dz affinity for RNA target;  $K_{cat}$ , maximum catalysis for RNA target;  $K_{cat}/K_m$ , Dz catalytic efficiency.

RNA target expressed within cells would be accessible for Dz858-15-15 hybridization and cleavage. Dz858-15-15 was co-transfected with the HCV RNA expression plasmid. For experimental purposes we chose as hosts the highly



**Fig. 4** Intracellular cleavage of HCV core protein RNA by Dz858-15-15. 293rtTA and HuH-7 cells were transfected with pHCV-UTR-core plasmid in the presence of a 1000-fold molar excess of Dz858-15-15 or mtDz858-15-15. After 24 h, total RNA was extracted and processed for quantitative RT-PCR. A summary graph of the per cent HCV RNA remaining after deoxyribozyme treatment for 293rtTA (left) or HuH-7 (right) cells treated with Dz858-15-15 (solid bar) or mtDz858-15-15 (open bar) is shown. \* $P \leq 0.05$  by Mann-Whitney Rank Sum test,  $n = 3$  independent transfection experiments.

transfectable human epithelial cell line 293rtTA, which is capable of generating a high level of expression plasmid RNA transcripts, and the HCV permissive hepatoma cell line HuH-7. As shown in Fig. 4, HCV RNA signal was greatly reduced in 293rtTA cells treated with Dz858-15-15 but not mtDz858-15-15. Results from three transfection experiments indicated that HCV RNA was reduced by  $48\% \pm 5\%$  SEM ( $P = 0.004$ , HCV RNA vs HCV RNA + Dz858-15-15; Fig. 4). This reduction in HCV RNA appeared not to be due simply to antisense annealing by the deoxyribozyme to its RNA target [7], as mtDz858-15-15, for which the catalytic domain alone was altered, exhibited only a  $19\% \pm 8\%$  SEM reduction in HCV RNA signal ( $P = 0.3$ , HCV RNA vs HCV RNA + mtDz858-15-15; Fig. 4).

Testing of Dz858-15-15 in the HCV host cell line HuH-7 ( $n = 3$ ) further confirmed that Dz858-15-15 was capable of reducing intracellular HCV RNAs (Fig. 4). Dz858-15-15 reduced HCV RNA in HuH-7 cells by  $32\% \pm 6\%$  SEM ( $P = 0.02$ , HCV RNA vs HCV RNA + Dz858-15-15), whereas mtDz858-15-15 reduced HCV RNA by only  $6\% \pm 2\%$  SEM ( $P = 0.2$ , HCV RNA vs HCV RNA + mtDz858-15-15; Fig. 4). Thus our intracellular studies indicate that Dz858-15-15 is capable of recognizing and cutting intracellular HCV RNA in two cell models.

## DISCUSSION

In spite of the encouraging results obtained with interferon and ribavirin, more than half of treated patients do not achieve stable viral loads or complete viral clearance [3].

Given the current lack of an effective vaccine [35] and an increasing risk of drug resistance because of HCV's high rate of mutation, pursuit of alternative HCV therapeutics remains a pressing issue [6,36,37].

We have designed and tested deoxyribozymes that recognize a conserved region of the HCV genome encoding the HCV core protein. Based on enzymatic analysis and intracellular studies, our leading deoxyribozyme candidate, namely Dz858-15-15, displayed enzymatic activities comparable with other therapeutically valuable deoxyribozyme targets [15,16,34] and was equal to or slightly superior to deoxyribozymes that have been reported to cleave intracellular HCV RNAs, as noted by a 32–48% reduction in HCV RNA after 24 h of deoxyribozyme exposure for human hepatoma and epithelial cells, respectively [7].

In our study we observed that increasing the 5' arm length of Dz858-9-15 from nine to 15 nucleotides (designated Dz858-15-15) increased the cleavage efficiency four-fold when measured in an *in vitro* cleavage assay (Table 2;  $K_{cat}/K_m$ ). The increase in Dz858-15-15 cleavage efficiency appeared in part because of a threefold decrease in  $K_m$  and a small increase in  $K_{cat}$ . These findings were consistent with observations seen by other investigators who also noted an increase in cleavage activity upon lengthening the deoxyribozyme recognition arms [7,24].

Previous studies which examined the secondary structure of HCV RNA indicate that RNA folding can influence the accessibility of antisense oligonucleotides to their HCV RNA counterparts [30,38]. One would anticipate that this issue is further compounded by the major and subtle structural differences seen among the various HCV subtypes and quasispecies [37]. We have attempted to avoid this possible pitfall by designing deoxyribozymes which recognize highly conserved regions contained within the HCV core protein coding sequence, as well as limiting our choice of deoxyribozymes to only those candidates which recognize conserved open structures found among the large repertoire of reported HCV genome sequences. We observed that the annealing arms of Dz858 appeared identical (100% homologous) to 36 of the 100 HCV sequences listed in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA databank, or differ by only one base pair for the remaining 64 listed sequences. The 100 RNA sequences that were homologous to Dz858-15-15 and contained within the NCBI databank listed sequences for three HCV subtypes (i.e. 1b, 2, and 4) as well as numerous viral strain variants. Thus our current Dz858-15-15 construct or ones which bear a single alternative nucleotide sequence should be able to recognize a broad range of HCV sequences, with a lessened possibility of inactivity because of limited recognition of HCV subtypes or the presence of a single mutational variation within the HCV RNA target. Using deoxyribozyme design methods similar to those outlined by Oketani *et al.* [7] and the m-fold program, we also examined possible secondary structures contained within the first two-thirds of the HCV genome (bases

1–6000). We observed that all of the 30 possible secondary structures generated by the m-fold program permitted annealing of Dz858-15-15 to a single-stranded region in our HCV-1b RNA sequence (JT, unpublished data).

Under simulated physiological conditions, Dz858-15-15 achieved maximal intracellular HCV RNA reductions of 32% and 48% in hepatoma and epithelial cells, respectively. Our inability to attain complete intracellular cleavage and an observed variance in intracellular cleavage between HuH-7 and 293rtTA suggests that Dz858-15-15 may have been sequestered to an unproductive intracellular location possibly bound to intracellular proteins via the phosphorothioate residues, or it may have encountered interference in its recognition of the HCV RNA target [38–41]. We, therefore, cannot assuredly state that we have achieved the maximum intracellular cleavage attainable in our two assay systems. It will be of interest to determine in future studies whether superior RNA cleavage can be attained upon application of newer nucleotide designs or the employment of alternative means for the introduction of deoxyribozymes into hepatocytes [39,42,43].

Deoxyribozymes are rapidly moving from being a research laboratory tool to becoming a full-fledged pharmacological strategy for the treatment of various human diseases [10,12]. Deoxyribozymes have been shown in several animal models to reduce the expression of detrimental RNAs and to abrogate disease pathology [44–46] and are currently in preclinical development for the treatment of cancer, genetic diseases and viral infections [7,16–20]. In an attempt to develop an effective therapeutic for HCV, our laboratory has tested and identified a deoxyribozyme which recognizes and cleaves a conserved region within the HCV core protein coding sequence. This deoxyribozyme was shown to significantly reduce intracellular HCV target RNA, and thus might prove to be a good candidate for further studies in clinical trial for HCV.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research grant no. 48310 (to CA, RLM, FA). The preliminary experiments were performed with financial support provided by Medical Research Council grant no. MOP-13754 (to RLM).

#### REFERENCES

- 1 Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S21–S29.
- 2 Shepherd J, Waugh N, Hewitson P. Combination therapy (interferon alfa and ribavirin) in the treatment of chronic hepatitis C: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess* 2000; 4: 1–67.
- 3 Sookotian SC. New therapies on the horizon for hepatitis C. *Ann Hepatol* 2003; 2: 164–170.
- 4 Hugle T, Cerny A. Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. *Rev Med Virol* 2003; 13: 361–371.
- 5 Zein NN. Clinical significance of hepatitis C genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 223–235.
- 6 Walker MP, Appleby TC, Zhong W, Lau JY, Hong Z. Hepatitis C virus therapies: current treatments, targets and future perspectives. *Antivir Chem Chemother* 2003; 14: 1–21.
- 7 Oketani M, Asahina Y, Wu CH, Wu GY. Inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression by a DNA ribonuclease. *J Hepatol* 1999; 31: 628–634.
- 8 Bartolome J, Castillo I, Carreno V. Ribozymes as antiviral agents. *Minerva Med* 2004; 95: 11–24.
- 9 Shippy R, Lockner R, Farnsworth M, Hampel A. The hairpin ribozyme. Discovery, mechanism, and development for gene therapy. *Mol Biotechnol* 1999; 12: 117–129.
- 10 Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 503–514.
- 11 Kashani-Sabet M. Ribozyme therapeutics. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2002; 7: 76–78.
- 12 Steele D, Kertsburg A, Soukup GA. Engineered catalytic RNA and DNA: new biochemical tools for drug discovery and design. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3: 131–144.
- 13 Goila R, Banerjee AC. Sequence specific cleavage of the HIV-1 coreceptor CCR5 gene by a hammer-head ribozyme and a DNA-enzyme: inhibition of the coreceptor function by DNA-enzyme. *FEBS Lett* 1998; 436: 233–238.
- 14 Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA. Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J Biol Chem* 2002; 277: 7099–7107.
- 15 Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4262–4266.
- 16 Wu Y, Yu L, McMahon R, Rossi JJ, Forman SJ, Snyder DS. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2847–2857.
- 17 Yen L, Strittmatter SM, Kalb RG. Sequence-specific cleavage of Huntington mRNA by catalytic DNA. *Ann Neurol* 1999; 46: 366–373.
- 18 Chakraborti S, Banerjee AC. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol Ther* 2003; 7: 817–826.
- 19 Goila R, Banerjee AC. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by novel DNA enzymes. *Biochem J* 2001; 353: 701–708.
- 20 Takahashi H, Hamazaki H, Habu Y *et al.* A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett* 2004; 560: 69–74.
- 21 Takamizawa A, Mori C, Fuke I *et al.* Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105–1113.
- 22 Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; 288: 911–940.

- 23 Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3406–3415.
- 24 Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Sun LQ. The influence of arm length asymmetry and base substitution on the activity of the 10–23 DNA enzyme. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10: 323–332.
- 25 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Mapping of RNA with ribonuclease and radiolabeled RNA probes. In: Nolan C, ed. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Plainview: Cold Spring Harbor Press, 1989: 7.71–7.78.
- 26 Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 3746–3750.
- 27 Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6409–6412.
- 28 Santoro SW, Joyce GF. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 1998; 37: 13330–13342.
- 29 Zhang X, Xu Y, Ling H, Hattori T. Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett* 1999; 458: 151–156.
- 30 Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y et al. The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* 1990; 60: 167–177.
- 31 Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Wang L, Sun LQ. Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 480–486.
- 32 Scherr M, Rossi JJ, Sczakiel G, Patzel V. RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 2455–2461.
- 33 Sioud M, Leirdal M. Design of nuclease resistant protein kinase c alpha DNA enzymes with potential therapeutic application. *J Mol Biol* 2000; 296: 937–947.
- 34 Asahina Y, Ito Y, Wu CH, Wu GY. DNA ribonucleases that are active against intracellular hepatitis B viral RNA targets. *Hepatology* 1998; 28: 547–554.
- 35 Koff RS. Hepatitis vaccines. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 83–95.
- 36 Ferenci P. Predicting the therapeutic response in patients with chronic hepatitis C: the role of viral kinetic studies. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 15–18.
- 37 Locarnini SA. Mechanisms of drug resistance and novel approaches to therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 (Suppl. 3): S351–S359.
- 38 Smith RM, Walton CM, Wu CH, Wu GY. Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol* 2002; 76: 9563–9574.
- 39 Richardson P, Kren BT, Steer CJ. In vivo application of non-viral vectors to the liver. *J Drug Target* 2002; 10: 123–131.
- 40 Wattiaux R, Jadot M, Laurent N, Dubois F, Wattiaux-De Coninck S. Cationic lipids delay the transfer of plasmid DNA to lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 448–454.
- 41 Stein CA. Antitumor effects of antisense phosphorothioate c-myc oligodeoxynucleotides: a question of mechanism. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 391–393.
- 42 Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1628–1644.
- 43 Juliano RL, Yoo H. Aspects of the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2: 297–303.
- 44 Khachigian LM. Deoxyribozymes: cutting a path to a new class of therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4: 119–121.
- 45 Santiago PS, Lowe HC, Kavurma MM et al. New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nat Med* 1999; 5: 1264–1269.
- 46 Santiago PS, Khachigian LM. Nucleic acid based strategies as potential therapeutic tools: mechanistic considerations and implications to restenosis. *J Mol Med* 2002; 79: 695–706.

Reduction in intracellular HCV RNA and virus protein expression in human hepatoma cells following treatment with 2'-O-methyl-modified anti-core deoxyribozyme

Janie B. Trepanier<sup>1,2</sup>, Jerome E. Tanner<sup>1</sup> and Caroline Alfieri<sup>1,2</sup>

Sainte-Justine Hospital Research Centre<sup>1</sup> and the Department of Microbiology and Immunology<sup>2</sup>, University of Montreal, Montreal, Qc, Canada

Address correspondence to: Caroline Alfieri, PhD


Sainte-Justine Hospital Research Centre

3175 Côte Sainte-Catherine Road

Montreal, Qc, Canada H3T 1C5

Tel: 1-514-345-4931 ext. 6135

Fax: 1-514-345-4801

Email: 

**Abstract**

HCV RNA is gaining greater consideration as a principal target for newer HCV antivirals because its destruction has the potential of eliminating the virus. These newer antivirals include deoxyribozymes (Dz), which are small single-stranded DNA molecules that cleave homologous RNA targets. Using a liver cell model containing functional genomic-length HCV-1b RNA we tested whether 2'-O-methyl-modified Dz, designed to recognize a highly-conserved RNA sequence located within the core-E1 coding region, could recognize and cleave its target sequence in the structural context of a functional HCV RNA molecule. Dz858-4-OMe contains four 2'-O-methyl nucleotide derivatives consecutively located on the distal ends of its two annealing arms. Intracellular HCV RNA, core protein and HCV antigen expression were reduced by 63%, 87% and 84%, respectively, when HCV RNA was challenged 6 hours post-transfection with Dz858-4-OMe. The observed reduction of intracellular HCV RNA and protein by Dz858-4-OMe suggests that it may constitute an attractive HCV antiviral.

Key words: Deoxyribozyme, DNzyme, HCV, antiviral, hepatitis C, catalytic DNA, HCV genomic RNA

## **Introduction**

Chronic hepatitis caused by the hepatitis C virus (HCV) constitutes a global health problem affecting a staggering 3% (170 million) of the world's population (Timm and Roggendorf, 2007). Over time, the chronic liver inflammation often leads to liver fibrosis, hepatocellular carcinoma or total liver failure (Chung, 2005; Leone and Rizzetto, 2005). In fact, HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma represent the leading causes of liver transplantation in developed countries (Hoofnagle, 1997). According to current standard of care, therapy consists of 24 to 48 weekly injections of interferon- $\alpha$  combined with oral ribavirin (Mangia, 2007). While treatment efficacy varies with virus subtypes (Arase et al. 2004; Shiffman et al. 2007), on average, this drug regimen achieves no more than a 54% to 61% sustained virologic response (SVR) in chronically infected individuals (Hughes and Shafran, 2006; Mangia, 2007). Low SVR is further compounded by the finding that many patients undergoing this drug regime experience serious side-effects, often leading to premature discontinuation of therapy, virus breakout or virus rebound (Sookoian, 2003).

Although newer serine protease- or viral RNA polymerase-based inhibitors have proven to be effective HCV antivirals, evidence suggests that the virus becomes resistant to these inhibitors, the result being a simple slowing of disease progression (Sheldon et al. 2007). A different therapeutic approach whose mode of action attempts to circumvent HCV mutant escape and directly eradicates intracellular HCV genomic RNA may be more appropriate (Trepanier et al. 2006a).

A promising strategy currently under investigation to target pathogenic mRNAs found in cancers (Fahmy et al. 2006), genetic diseases (Yen et al. 1999) and in various

viral infections (Chakraborti and Banerjee, 2003; Lu et al. 2005; Takahashi et al. 2004; Zhao et al. 2003) involves the use of small enzymatic DNA molecules called DNAzymes or deoxyribozymes (Santoro and Joyce, 1998). These molecules are 30 to 40 nucleotides in length and consist of a catalytic core flanked by two RNA-target-specific annealing arms. Deoxyribozymes have several advantages over other oligonucleotide-based therapeutics. These include their autocatalytic ability to cleave cytoplasmic RNAs without the requirement for RNase H (Crooke, 2004). Further, deoxyribozymes are less impacted by mutational changes in target RNAs or sequence positional effects compared to antisense DNA or small inhibitory (si)RNA (Schubert et al. 2004; Smith and Wu, 2003; Westerhout et al. 2005; Wilson and Richardson, 2005).

In order for deoxyribozymes to be most effective in recognizing the myriad of HCV variants and quasispecies, their target sequence should be highly conserved among the major virus genotypes, remain relatively immutable to selective pressures and be accessible to the deoxyribozyme. Highly conserved and relatively stable RNA sequences can be found clustered throughout the HCV genome, but reside principally within the 5' and 3' UTRs, as well as the core protein and NS5 coding domains (Turner et al. 2004). It is hypothesized that sites of high sequence conservation are required to maintain secondary and tertiary RNA structures essential for virus RNA translation, replication and stability (Tuplin et al. 2004).

In this study, we examined whether a highly conserved and predicted 'open' RNA structure located near the core:E1 RNA coding sequence boundary (Tuplin et al. 2004) was susceptible to deoxyribozyme cleavage when present in hepatocytes and within the context of a functional genomic-length HCV RNA.



## Results and Discussion

HCV replication involves no DNA intermediate (Moradpour and Blum, 2004). In theory, destruction of intracellular HCV RNA would eliminate the virus from the cell. For this reason HCV RNA is gaining greater consideration and importance as a principal target for newer HCV antivirals (Romero-Lopez et al. 2006). Until recently many laboratories tested various oligonucleotide-based platforms for *in vitro*- or culture-based efficacy using subgenomic RNA fragments (Oketani et al. 1999; Smith et al. 2002; Trepanier et al. 2006b), however one must acknowledge that recognition of subgenomic targets by a therapeutic oligonucleotide does not always faithfully translate into an equivalent or sufficient level of efficacy when challenged with endogenous, full-length RNA (Smith et al. 2007; Swiatkowska et al. 2007). Long RNAs, such as HCV are highly structured molecules wherein up to 90% of putative cleavage sites were found to be inaccessible upon testing (Schubert et al. 2004). Even with the advent of the HCV 2b JFH-1 strain/Huh-7 hepatoma replicative cell culture model, investigators are still restricted in their drug testing (Wakita et al. 2005). Currently no other natural HCV strain has been shown to replicate as efficiently in culture without adaptive mutations (Pietschmann et al. 2006) and since these adaptive mutations appear to confer unusual biological properties to the virus (Moriishi and Matsuura, 2007), it may be difficult to assess their biological relevance when testing antivirals (Kato et al. 2007). Based on a recent report wherein the introduction of a synthetic copy of HCV JFH-1 RNA into Huh-7 cells resulted in the translation and processing of the HCV polyprotein for complete virus replication (Rouille et al. 2006), we examined whether the introduction of an *in*

*vitro* synthesized copy of the HCV genotype 1b would similarly lead to proper processing and mimic viral replication in Huh-7 cells. We chose to test the HCV 1b genotype given its prevalence in the worldwide population, increased virulence and poor replication in culture (Zein, 2000; Kato et al. 2007). If successful, our approach would mimic or exceed the level of viral RNA and protein found in culture systems employing the JFH-1 viral strain. Following RNA transfection, the synthetic genomic-length RNA was expected to locate within the cytoplasm and fold into a functionally active form as evidenced by its translation and the expression of properly processed HCV polyprotein. Once verified, this HCV RNA could serve as a target, comparable to endogenous HCV RNA and act as a rapid screening method with which to test our library of deoxyribozymes. As shown in Fig. 1 panels B and C, HCV antigens, including the mature form of the virion core protein (Yasui et al. 1998), were detected in Huh-7 cells at 24 hours following HCV RNA transfection and cell culture. This indicated that the synthetic genomic-length HCV 1b RNA properly located to the cytoplasm and folded into a functionally active form capable of RNA translation initiation from the HCV IRES.

Prior results from our laboratory indicated that challenge of a subgenomic HCV RNA fragment encoding a complete 5'UTR and core coding sequence with the phosphorothioate (PS)-linked anti-core deoxyribozyme (Dz858-2-PS) yielded a 32% reduction in target RNA as measured by RT-qPCR (Trepanier et al. 2006b). In order to develop a therapeutically useful molecule it was necessary to enhance its enzymatic activity through increased DNA:RNA annealing and to eliminate or lessen PS-induced or CpG-induced toxicity by employing 2'-O-methyl- (OMe-) modified nucleotides (Jason et al. 2004; Judge et al. 2006; Kurreck, 2003). Newer Dz858 variants were initially tested in

an *in vitro* assay under physiologic conditions to better gauge whether increased enzymatic activity would occur in our cell culture model (Sood et al. 2007). Nonspecific RNA loss or aberrant cleavage was monitored using a version of Dz858 that contained an ablated catalytic site (mtDz858) (Santoro and Joyce, 1997). Results from *in vitro* testing indicated that a Dz858 variant containing four 2'-O-methyl (OMe) additions on each annealing arm (Dz858-4-OMe) exhibited a four-fold higher level of enzymatic activity compared to the previously reported Dz858-2-PS ( $2.1 \times 10^5$  kcat/Km for Dz858-4-OMe versus  $5.7 \times 10^4$  kcat/Km for Dz858-2-PS, Table 1) and exhibited an enzymatic activity comparable to unmodified Dz858 ( $2.4 \times 10^5$  kcat/Km, Table 1). Incubation of the RNA target with 1000-fold molar excess of catalytically ablated Dz858 (mtDz858) revealed no detectable cleavage activity (Fig. 2). Also, unlike earlier reports (Schubert et al. 2003), we noted that deoxyribozymes having OMe-modified nucleotides within the catalytic core (Dz858-4-OMe, 6-OMe core) did not increase cleavage activity; instead, we observed a significant loss in enzyme activity (Fig. 2 and Table 1).

Five different deoxyribozyme constructs were tested in the HCV cell culture assay for their ability to reduce HCV RNA, namely 1) Dz858-4-OMe, 2) Dz858-2-PS, 3) Dz2 which is an anti-core deoxyribozyme (Oketani et al, 1999), 4) an OMe-modified variant of Dz2 (Dz2-4-OMe), and 5) a Dz858 background control deoxyribozyme constructed as a sense-mutant variant of Dz858 (mtDz858Sen). Deoxyribozymes were transfected into Huh-7 cells at a fixed concentration of 23 nM (Dz:HCV RNA molar ratio of 75:1) 6 hours after HCV RNA transfection to allow for HCV RNA processing and to rule out possible cleavage of HCV RNA prior to its entry into Huh-7 cells. Results from three independent experiments indicated that Dz858-4-OMe reduced HCV RNA on

average by  $62.5\% \pm 6.3$  SEM following the subtraction of any observed mtDz858Sen activity (Fig. 3A); whereas Dz858-2-PS and Dz2 yielded no marked change in HCV RNA reduction compared to mtDz858Sen. Comparison of Dz858-4-OMe to its like-modified Dz2 variant (Dz2-4-OMe) indicated that in-kind addition of O-Me to a deoxyribozyme does not ensure strong efficacy, as Dz2-4-OMe appeared to reduced HCV RNA by only  $12.2\% \pm 5.4$  SEM (Fig. 3A). The reduction of HCV RNA after Dz858-4-OMe treatment was statistically significant ( $p$  value  $< 0.004$ ) compared to Dz2, Dz2-4-OMe or Dz858-2-PS.

In conjunction with a reduction in HCV RNA, we also noted a reduction in core protein and HCV antigen expression. Thirty hours after Dz858-4-OMe addition, HCV core protein was reduced by 59% when measured by immunoblot and normalization with cellular actin protein and subtraction of mtDz858Sen background activity (Fig. 3B). Parallel experiments that measured HCV antigen levels were also performed. Following deoxyribozyme treatment, immunostaining and digital quantitation of HCV antigen immunofluorescence results indicated that Dz858-4-OMe reduced HCV antigen immunofluorescence by 84% (following subtraction of background mock fluorescence) (Fig. 3C). By comparison, HCV antigen immunofluorescence following mtDz858Sen treatment did not differ significantly from that of mock treatment (Fig. 3C).

HCV replication involves no DNA intermediate and is entirely RNA dependent (Moradpour and Blum, 2004). In theory, destruction of intracellular HCV RNA should eliminate the virus from the cell. Unfortunately the propensity of HCV to mutate rapidly has made HCV RNA an elusive quarry. Poor annealing and removal of an intracellular target RNA is generally linked to an inability of oligonucleotides to access their

counterpart sequences within the highly structured environment of a large RNA molecule (Gallo et al. 2003). We have tested and observed that an anti-core deoxyribozyme variant, Dz858-4-OMe, recognized and reduced intracellular HCV RNA by 62.5%, whereas the similarly modified anti-core deoxyribozyme Dz-2-4-OMe reduced HCV RNA by only 12.2%. Other anti-core deoxyribozyme variants tested failed to significantly reduce HCV RNA levels (Fig. 3A). The observed reduction of HCV RNA was further supported by our observation that HCV core protein and HCV antigen expression were reduced by 59% and 84%, respectively.

Unlike prior studies that tested antisense DNAs, ribozymes or deoxyribozymes with subgenomic HCV RNA targets (Romero-Lopez et al. 2006) or chimeric viral replicons (Randall et al. 2003), our study is the first to report the reduction of genomic HCV 1b in hepatic cell cultures following challenge with a deoxyribozyme-based anti-viral. Given that the amount of synthetic HCV RNA used in our cell culture experiments (325 ng) equates to  $6 \times 10^{10}$  genomic copies per cell culture, which would far exceed the number of expected HCV RNA genome copies found in the HCV 2b JFH-1 strain/Huh-7 replicative cell culture model (Kato et al. 2007; Randall et al. 2007), our results also testify to the robustness of our rapid-screen cell culture system and the strength in efficacy of Dz858-4-OMe. The concentration of Dz858-4-OMe (23 nM) needed to achieve the marked reduction in intracellular HCV RNA and HCV proteins was far lower than that reported for other deoxyribozymes, ribozymes and antisense oligonucleotides for other pathogenic cell models whose effective doses ranged from 750 to 1000 nM (Beale et al. 2003; Oketani et al. 1999). The Dz858-4-OMe concentration also compared

favourably to siRNA whose effective dose ranged from 25 to 100 nM (Beale et al. 2003; Randall et al. 2003; Seo et al. 2003; Watanabe et al. 2007).

Gene targeting using oligonucleotide-based strategies, including deoxyribozymes, is gaining greater acceptance among medical researchers as a valid antiviral platform by virtue of its precision targeting of pivotal gene processes in the pathogenesis of disease. And although deoxyribozymes offer several advantageous features beyond those found for antisense or siRNA technologies, their acceptance has been slow, due in part to an apparent limit in their reaction rates compared to protein enzymes (Breaker et al. 2003) whose rates of reaction are several orders of magnitude greater than the various oligonucleotide enzymes. RNA cleavage by the various oligonucleotide enzymes are all believed to proceed through nucleophilic attack by the 2'-oxygen of the ribose moiety on the phosphorus center of the adjacent internucleotide linkage. Several distinct catalytic mechanisms have been proposed to explain how oligonucleotide-based enzymes, including deoxyribozymes, can accelerate this chemical reaction. These include in-line nucleophilic attack, neutralization of the negative charge on a non-bridging phosphate oxygen, deprotonation of the 2'-hydroxyl group and neutralization of the negative charge on the 5'-oxygen atom (Breaker et al. 2003). However, unlike most oligonucleotide enzymes that are limited to the in-line nucleophilic attack or neutralization of negative charge on a non-bridging phosphate oxygen for their catalysis, deoxyribozymes such as Dz858, display a more complex kinetic behavior, suggesting that they can use multiple catalytic mechanisms (Emilsson and Breaker, 2002). 2'-O-methyl-modified nucleotides are reported to increase deoxyribozyme activity through increased DNA:RNA affinity. Our observation that Dz858-OMe efficacy differed markedly from an in-kind OMe-

modified anti-core deoxyribozyme (Dz2-4-OMe) and the knowledge that Dz858-2-PS contains annealing sequences identical to Dz858-4-OMe but displayed an inability to reduce intracellular HCV RNA suggest that O-Me-nucleotides must work in conjunction with amenable nucleotide sequences to increase enzyme activity (Lima et al. 1997).

In an attempt to develop an effective HCV antiviral, our laboratory has designed a deoxyribozyme that significantly reduced intracellular HCV RNA and protein, thus positioning Dz858-4-OMe as a formidable HCV antiviral that may be added to and used in conjunction with the current arsenal of HCV antivirals.

## Materials and methods

### *Deoxyribozyme design and construction*

HCV genotypes ([www.hcvdb.org](http://www.hcvdb.org)) were surveyed using database mining of pan-HCV conserved secondary sequences (<http://rna.tbi.univie.ac.at/virus/>) in conjunction with RNA secondary structure prediction software ([www.tbi.univie.ac.at/RNA/](http://www.tbi.univie.ac.at/RNA/)) and the m-fold computer program ([www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold)) (Zuker 2003) for highly conserved, open-structured RNA sequences (Turner et al. 2004). An optimum RNA sequence located near the core:E1 RNA, (nucleotides 844-8740) (Takamizawa et al. 1991) was found having deoxyribozyme cleavage potential. Deoxyribozymes for the site of RNA cleavage (nucleotide 858) containing phosphorothioate (PS), 2'-O-methyl (OMe) modifications, as well as Dz858 homologues with ablated catalytic sites (mtDz858) or a sense strand to represent the catalytically ablated version of Dz858 (mtDz858Sen), which serve as control deoxyribozymes to distinguish *in vitro* or *in vivo* non-specific cleavage and reduction in HCV RNA, respectively, were chemically synthesized and purified by Na<sup>+</sup> salt exchange (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) (Table 1). Na<sup>+</sup> salt exchange was recommended by the manufacturer over HPLC purification, as the latter purification method may introduce cytotoxic triethylammonium acetate into our tissue cultures. Oligomers purified using Na<sup>+</sup> salt exchange have previously been used in several cell culture systems to successfully control gene expression (Dagle et al. 1990; Hu et al. 2003; Kalota and Opalinska, 2007).



### *In vitro synthesis of HCV RNA*

A 976 base HCV type 1b RNA subgenomic fragment was used to measure and screen the amount of *in vitro* cleavage by various Dz858 constructs. [<sup>32</sup>P]-radiolabeled HCV RNA was generated from pGEM-7Zf-HCV DNA template (kindly provided by Dr S. Mounir, Shire Pharmaceuticals, Laval, QC) containing the bacteriophage T7 RNA polymerase promoter located adjacent to a HCV 1b 5'UTR and the core protein coding sequence (Takamizawa et al. 1991). RNA was synthesized from 1 µg of PCR generated DNA template using the MegaScript T7 transcription kit (Ambion Inc., Austin, TX) and T7 RNA polymerase (Ambion Inc.) in the presence or absence of [<sup>32</sup>P]UTP (20 mCi/ml, 800 Ci/mmol) (Amersham, Piscataway, NJ)(Trepanier et al. 2006b). Genomic-length HCV RNA was also synthesized by *in vitro* transcription from 1 µg of pGEM-7Zf-HCV following its linearization with *Xba* I. Transcription reactions proceeded at 37°C for 6 hours followed by DNA template removed using RNase-free DNase (Ambion Inc.), phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Both the 976 base subgenomic fragment and the full-length HCV RNA products were assayed for size and integrity using 6% polyacrylamide gels containing 8 M urea and Tris-borate buffer or 0.8% formaldehyde-agarose gels, respectively (Sambrook J et al. 1989).

### *K<sub>m</sub> and k<sub>cat</sub> determinations*

[<sup>32</sup>P]-radiolabeled 976 base RNA substrate (100 nM) was incubated for 1 hour at 37°C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and increasing log<sub>10</sub> concentrations of deoxyribozymes ranging from 0.01 to 100 µM. Cleavage reactions were terminated by addition of 95% formamide gel loading buffer, and cleavage products

were resolved by PAGE containing 8 M urea. Band intensity was quantified using the SI PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

The  $K_m$  and  $k_{cat}$  values for deoxyribozymes were determined using the Michaelis-Menten enzyme equation  $Y = (V_{max} * X)/(K_m + X)$  and the equation  $k_{cat} = V_{max}/S_t$ , respectively, where the  $V_{max}$  was obtained empirically, Y represents the % cleavage, X represents the deoxyribozyme concentration and  $S_t$  represents the original substrate concentration of 100 nM (Prism 3.03 software, GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

#### *HCV RNA and protein expression following deoxyribozyme treatment*

Huh-7 cells (kindly provided by Dr Tatsuo Takahashi, Health Science Research Resources Bank, Japan) were seeded at  $2.4 \times 10^5$  /well in 12-well plates and cultured overnight in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Mediacorp Inc., Montreal, Qc). They were then transfected with 325 ng of synthetic full-length HCV 1b RNA using 3  $\mu$ g Lipofectamine 2000. After 6 hours the cells were washed with PBS and transfected with 23 nM of individual deoxyribozymes (molar ratio of 75:1). This concentration of deoxyribozyme had previously been shown to exhibit a maximal difference in HCV RNA reduction when comparing serial doses of Dz858-4-OMe to mtDz858Sen, as measured by RT-qPCR (J. B. Trepanier, unpublished).

HCV RNA concentrations were measured by RT-qPCR using the HCV sense primer 5'-GGCGTGA ACTATGCAACAGGGAAT-3', 6'-carboxyfluorescein, succinimidyl ester (FAM)-labelled probe 5'-TTCCGCTTACGAAGTGCACAACGTGT-3' and antisense primer 5'-TGGAGCAGTCGTTTCGTGACATGAT-3' (Integrated DNA

Technologies, Coralville, IA) in conjunction with the QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit (Qiagen, Mississauga, ON) and Brilliant Multiplex QPCR master mix containing carboxy-x-rhodamine succinimidyl ester (ROX) reference dye (Stratagene Inc., La Jolla, CA). Primers and probes were used at final concentrations of 400 nM and 200 nM, respectively. HCV cDNA was amplified and quantified using the Mx3000P real-time PCR thermocycler (Stratagene Inc.) using 45 cycles, each cycle consisting of a 15-second incubation at 95°C and a 1-minute annealing-elongation step at 60°C. Logarithmic concentrations of pHCV-UTR-core plasmid ranging from 1 pg to 10 ng served as HCV PCR template reference standards. Cellular HCV RNA concentrations were normalized using  $\beta$ -actin which was also measured by RT-qPCR.  $\beta$ -actin cDNA was amplified using  $\beta$ -actin sense primer 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3' and antisense primer 5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3' in conjunction with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen).

HCV core protein found in HCV RNA transfected Huh-7 cell extracts was detected by immunoblot following incubation with pooled and absorbed HCV 1b-positive human serum (1:500) obtained from 10 HCV 1b genotype-positive, high viral load patients (kind gift from Dr H. Soudeyns, Sainte-Justine Hospital). We elected to use pooled human serum in order to maximize assay sensitivity for HCV virion proteins (Brochot et al. 2007). Following incubation with human serum, blots were treated with biotinylated-goat (Fab)<sub>2</sub> anti-human IgG (1:8000), horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin (1:6000, Sigma-Aldrich, Oakville, ON) and chemiluminescence substrate (Sigma-Aldrich).

Overall HCV antigen expression was measured by immunofluorescence. Huh-7 cells that were seeded onto glass chamber slides (Nalgene Nunc, Naperville, IL), transfected

with full-length HCV RNA and treated after 6 hours with deoxyribozymes were cultured for an additional 30 hours before processing for immunofluorescence. In brief, methanol-fixed cells were incubated with pooled and absorbed HCV 1b-positive human serum (1:50) followed by incubation with biotinylated goat (Fab)<sub>2</sub> anti-human IgG (1:600, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) and 3 µg/ml dichlorotriazinyl amino fluorescein (DTAF)-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch). Digital quantitation immunoblots of HCV core protein expression or HCV antigen immunofluorescence found in eight to 10 independent microscopic fields was performed using ImageJ software (Rasband, W.S., US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

**Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, grants #48310 and #82572 (to CA). JBT is the recipient of doctoral awards from the Fonds de Recherche en Santé du Québec, the Sainte-Justine Hospital Foundation and the Department of Microbiology and Immunology/University of Montréal. We thank Dr Hugo Soudeyns (Sainte-Justine Hospital Research Center, Qc, Canada) for the HCV-positive human sera and we sincerely appreciate the efforts provided by Drs Nathalie Majeau and Denis Leclerc (Centre de Recherche en Infectiologie du CHUL/CHUQ, Qc, Canada) towards development of a quantitative assay for HCV core protein.

## References

- Arase, Y., Suzuki, F., Tsubota, A., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M., Akuta, N., Someya, T., Hosaka, T., Kobayashi, M., Sezaki, H., Ikeda, K., Kumada, H., 2004. Sustained negativity for HCV-RNA over 24 or more months by long-term interferon therapy correlates with eradication of HCV in patients with hepatitis C virus genotype 1b and high viral load. *Intervirology* 47, 19-25.
- Beale, G., Hollins, A. J., Benboubetra, M., Sohail, M., Fox, S. P., Benter, I., Akhtar, S., 2003. Gene silencing nucleic acids designed by scanning arrays: anti-EGFR activity of siRNA, ribozyme and DNA enzymes targeting a single hybridization-accessible region using the same delivery system. *J. Drug Target* 11, 449-456.
- Breaker, R. R., Emilsson, G. M., Lazarev, D., Nakamura, S., Puskarz, I. J., Roth, A., Sudarsan, N., 2003. A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes. *RNA*. 9, 949-957.
- Brochot, E., Duverlie, G., Castelain, S., Morel, V., Wychowski, C., Dubuisson, J., Francois, C., 2007. Effect of ribavirin on the hepatitis C virus (JFH-1) and its correlation with interferon sensitivity. *Antivir. Ther.* 12, 805-813.
- Chakraborti, S., Banerjee, A. C., 2003. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol. Ther.* 7, 817-826.

Chung, R. T., 2005. Acute hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 1, S14-S17.

Crooke, S. T., 2004. Progress in antisense technology. *Annu. Rev. Med.* 55, 61-95.

Dagle, J. M., Walder, J. A., Weeks, D. L., 1990. Targeted degradation of mRNA in *Xenopus* oocytes and embryos directed by modified oligonucleotides: studies of An2 and cyclin in embryogenesis. *Nucleic Acids Res.* 18, 4751-4757.

Emilsson, G. M., Breaker, R. R., 2002. Deoxyribozymes: new activities and new applications. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 596-607.

Fahmy, R. G., Waldman, A., Zhang, G., Mitchell, A., Tedla, N., Cai, H., Geczy, C. R., Chesterman, C. N., Perry, M., Khachigian, L. M., 2006. Suppression of vascular permeability and inflammation by targeting of the transcription factor c-Jun. *Nat. Biotechnol.* 24, 856-863.

Gallo, M., Montserrat, J. M., Iribarren, A. M., 2003. Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 143-151.

Hoofnagle, J. H., 1997. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26, S15-S20.

Hu, Y., Cherton-Horvat, G., Dragowska, V., Baird, S., Korneluk, R. G., Durkin, J. P., Mayer, L. D., LaCasse, E. C., 2003. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 9, 2826-2836.

Hughes, C. A., Shafran, S. D., 2006. Chronic hepatitis C virus management: 2000-2005 update. *Ann. Pharmacother.* 40, 74-82.

Jason, T. L., Koropatnick, J., Berg, R. W., 2004. Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 66-83.

Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C., MacLachlan, I., 2006. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol. Ther.* 13, 494-505.

Kalota, A., Opalinska, J. B., 2007. Design of antisense oligonucleotides and short interfering RNA duplexes (siRNA) targeted to BCL6 mRNA: towards rational drug development for specific lymphoma subsets. *Blood Cells Mol. Dis.* 38, 199-203.

Kato, T., Matsumura, T., Heller, T., Saito, S., Sapp, R. K., Murthy, K., Wakita, T., Liang, T. J., 2007. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J. Virol.* 81, 4405-4411.



- Kurreck, J., 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 270, 1628-1644.
- Leone, N., Rizzetto, M., 2005. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 51, 31-46.
- Lima, W. F., Brown-Driver, V., Fox, M., Hanecak, R., Bruice, T. W., 1997. Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J. Biol. Chem.* 272, 626-638.
- Lu, Z. X., Ye, M., Yan, G. R., Li, Q., Tang, M., Lee, L. M., Sun, L. Q., Cao, Y., 2005. Effect of EBV LMP1 targeted DNAzymes on cell proliferation and apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 12, 647-654.
- Mangia, A., 2007. Short-duration therapy for hepatitis C: suitable for all? *J. Viral Hepat.* 14, 221-227.
- Moradpour, D., Blum, H. E., 2004. A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver Int.* 24, 519-525.
- Moriishi, K., Matsuura, Y., 2007. Evaluation systems for anti-HCV drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1213-1221.

Oketani, M., Asahina, Y., Wu, C. H., Wu, G. Y., 1999. Inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression by a DNA ribonuclease. *J. Hepatol.* 31, 628-634.

Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., Bartenschlager, R., 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 7408-7413.

Randall, G., Grakoui, A., Rice, C. M., 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 235-240.

Randall, G., Panis, M., Cooper, J. D., Tellinghuisen, T. L., Sukhodolets, K. E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B. D., Chien, M., Weir, D. B., Russo, J. J., Ju, J., Brownstein, M. J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., Rice, C. M., 2007. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 12884-12889.

Romero-Lopez, C., Sanchez-Luque, F. J., Berzal-Herranz, A., 2006. Targets and tools: recent advances in the development of anti-HCV nucleic acids. *Infect. Disord. Drug Targets.* 6, 121-145.

Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C., Dubuisson, J., 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.* 80, 2832-2841.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Mapping of RNA with ribonuclease and radiolabeled RNA probes. In: Nolan C (Ed.). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 7.71-7.78.

Santoro, S. W., Joyce, G. F., 1997. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 4262-4266.

Santoro, S. W., Joyce, G. F., 1998. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 37, 13330-13342.

Schubert, S., Furste, J. P., Werk, D., Grunert, H. P., Zeichhardt, H., Erdmann, V. A., Kurreck, J., 2004. Gaining target access for deoxyribozymes. *J. Mol. Biol.* 339, 355-363.

Schubert, S., Gul, D. C., Grunert, H. P., Zeichhardt, H., Erdmann, V. A., Kurreck, J., 2003. RNA cleaving '10-23' DNazymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res.* 31, 5982-5992.

Seo, M. Y., Abrignani, S., Houghton, M., Han, J. H., 2003. Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J. Virol.* 77, 810-812.

Sheldon, J., Barreiro, P., Vincent, V., 2007. Novel protease and polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 16, 1171-1181.

Shiffman, M. L., Suter, F., Bacon, B. R., Nelson, D., Harley, H., Sola, R., Shafran, S. D., Barange, K., Lin, A., Soman, A., Zeuzem, S., 2007. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N. Engl. J. Med.* 357, 124-134.

Smith, R. M., Smolic, R., Volarevic, M., Wu, G. Y., 2007. Positional effects and strand preference of RNA interference against hepatitis C virus target sequences. *J. Viral Hepat.* 14, 194-212.

Smith, R. M., Walton, C. M., Wu, C. H., Wu, G. Y., 2002. Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J. Virol.* 76, 9563-9574.

Smith, R. M., Wu, G. Y., 2003. Structure-based design of hepatitis C virus inhibitors. *J. Viral Hepat.* 10, 405-412.

Sood, V., Unwalla, H., Gupta, N., Chakraborti, S., Banerjee, A. C., 2007. Potent knock down of HIV-1 replication by targeting HIV-1 Tat/Rev RNA sequences synergistically with catalytic RNA and DNA. *AIDS* 21, 31-40.

Sookoian, S. C., 2003. New therapies on the horizon for hepatitis C. *Ann. Hepatol.* 2, 164-170.

Swiatkowska, A., Dutkiewicz, M., Ciesiolka, J., 2007. Structural features of target RNA molecules greatly modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribosymes. *Biochemistry* 46, 5523-5533.

Takahashi, H., Hamazaki, H., Habu, Y., Hayashi, M., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., Takaku, H., 2004. A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett.* 560, 69-74.

Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., Okayama, H., 1991. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 65, 1105-1113.

Turner, C., Witwer, C., Hofacker, I. L., Stadler, P. F., 2004. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J. Gen. Virol.* 85, 1113-1124.

Timm, J., Roggendorf, M., 2007. Sequence diversity of hepatitis C virus: Implications for immune control and therapy. *World J. Gastroenterol.* 13, 4808-4817.

Trepanier, J. B., Tanner, J. E., Alfieri, C., 2006a. Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection. *Antivir. Ther.* 11, 273-287.

Trepanier, J., Tanner, J. E., Momparler, R. L., Le, O. N., Alvarez, F., Alfieri, C., 2006b. Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes. *J. Viral Hepat.* 13, 131-138.

Tuplin, A., Evans, D. J., Simmonds, P., 2004. Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J. Gen. Virol.* 85, 3037-3047.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791-796.

Watanabe, T., Umehara, T., Yasui, F., Nakagawa, S. I., Yano, J., Ohgi, T., Sonoke, S., Satoh, K., Inoue, K., Yoshida, M., Kohara, M., 2007. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J. Hepatol.* 47, 744-750.

Westerhout, E. M., Ooms, M., Vink, M., Das, A. T., Berkhout, B., 2005. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res.* 33, 796-804.

Wilson, J. A., Richardson, C. D., 2005. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J. Virol.* 79, 7050-7058.

Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., Kohara, M., 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72, 6048-6055.

Yen, L., Strittmatter, S. M., Kalb, R. G., 1999. Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann. Neurol.* 46, 366-373.

Zein, N. N., 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev* 13, 223-235.

Zhao, C. A., Zhao, X. D., Yu, H. G., Wu, Y. P., Yang, X. Q., 2003. Inhibition of respiratory syncytial virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNase. *Zhonghua Er. Ke. Za Zhi.* 41, 594-597.

Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.

**Table 1:** Deoxyribozyme sequences and catalytic constants

Dz858	GAGCCAAGAGGAAGAGGCTAGCTACAACGAAGAAAAAGAGCAACC
Dz858-2-PS	G <sup>S</sup> A <sup>S</sup> GCCAAGAGGAAGAGGCTAGCTACAACGAAGAAAAAGAGCAA <sup>S</sup> C <sup>S</sup> C
Dz858-2-OMe	<sup>M</sup> G <sup>M</sup> AGCCAAGAGGAAGAGGCTAGCTACAACGAAGAAAAAGAGCAA <sup>M</sup> C <sup>M</sup> C
Dz858-4-OMe	<sup>M</sup> G <sup>M</sup> A <sup>M</sup> G <sup>M</sup> CCAAGAGGAAGAGGCTAGCTACAACGAAGAAAAAGAGC <sup>M</sup> A <sup>M</sup> A <sup>M</sup> C <sup>M</sup> C
Dz858-4-OMe, -6-OMe-core	<sup>M</sup> G <sup>M</sup> A <sup>M</sup> G <sup>M</sup> CCAAGAGGAAGAG <sup>M</sup> GCTAG <sup>M</sup> C <sup>M</sup> UAC <sup>M</sup> AAC <sup>M</sup> G <sup>M</sup> AAGAAAAAGAGC <sup>M</sup> A <sup>M</sup> A <sup>M</sup> C <sup>M</sup> C
Dz858-6-OMe- core	GAGCCAAGAGGAAGAG <sup>M</sup> GCTAG <sup>M</sup> C <sup>M</sup> UAC <sup>M</sup> AAC <sup>M</sup> G <sup>M</sup> AAGAAAAAGAGCAACC
mtDz858	GAGCCAAGAGGAAGAGG <u>G</u> AGCTACAACGAAGAAAAAGAGCAACC
mtDz858Sen	GGTTGCTCTTTTTCTGG <u>G</u> AGCTACAACGATCTTCTCTTGGCTC
Dz2	G <sup>S</sup> C <sup>S</sup> ACGGTCTACGAGAGGCTAGCTACAACGACTCCCGGGGCACT <sup>S</sup> C <sup>S</sup> G
Dz2-4-OMe	<sup>M</sup> G <sup>M</sup> C <sup>M</sup> A <sup>M</sup> CGGTCTACGAGAGGCTAGCTACAACGACTCCCGGGGCA <sup>M</sup> C <sup>M</sup> T <sup>M</sup> C <sup>M</sup> G

DNAzyme	K <sub>m</sub> (mol/L)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mol/L) <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
Dz858	4.9 x 10 <sup>-8</sup>	1.2 x 10 <sup>-2</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>
Dz858-2-PS	2.1 x 10 <sup>-7</sup>	1.2 x 10 <sup>-2</sup>	5.7 x 10 <sup>4</sup>
Dz858-2-OMe	8.6 x 10 <sup>-8</sup>	9.4 x 10 <sup>-3</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup>
Dz858-4-OMe	5.3 x 10 <sup>-8</sup>	1.1 x 10 <sup>-2</sup>	2.1 x 10 <sup>5</sup>
Dz858-4-OMe, 6-OMe core	5.8 x 10 <sup>-8</sup>	4.9 x 10 <sup>-3</sup>	8.5 x 10 <sup>4</sup>
Dz858-6-OMe core	5.8 x 10 <sup>-8</sup>	5.4 x 10 <sup>-3</sup>	9.3 x 10 <sup>4</sup>

Catalytic mutant, mt, underlined; S or PS, phosphorothioate; M or OMe, 2'-O-methyl; core, catalytic domain (sequence shown in bold).

K<sub>m</sub> and k<sub>cat</sub> values were determined using the Michaelis-Menten enzyme equation  $Y = (V_{\max} * X)/(K_m + X)$  and the equation  $k_{\text{cat}} = V_{\max}/S_t$ , respectively, where the V<sub>max</sub> was obtained empirically, Y represents the % cleavage, X represents the deoxyribozyme concentration and S<sub>t</sub> represents the original substrate concentration of 100 nM.



Fig. 1. Expression of HCV proteins in Huh-7 cells following transfection of synthetic, genomic-length HCV RNA (A). Huh-7 cells either sham transfected (Mock), transfected with HCV RNA (HCV RNA) or with HCV core protein eukaryotic expression plasmid (pHCV-core). HCV protein expression was measured after 24 h of cell culture either by immunofluorescence (B) or after an equal amount of Huh-7 cellular protein was processed for SDS-PAGE and immunoblot (C).

Fig. 2. Schematic of Dz858 cleavage target and *in vitro* cleavage of HCV RNA by Dz858 variants. The plot of percent (%) RNA cleavage  $\pm$  SEM versus deoxyribozyme concentration was based on three independent experiments.

Fig. 3. Reduction in intracellular HCV RNA (A), HCV core protein (B) and HCV antigen reactivity (C) in Huh-7 cells following treatment with Dz858-4-OMe. Total cellular RNA was harvested at 24 h post-transfection and plotted as percent HCV RNA reduction  $\pm$  SEM from four independent experiments following total RNA normalization with  $\beta$ -actin RNA (A). Cell protein or microscope slides containing Huh-7 cells were processed 36 h post-transfection for immunoblot (B) or HCV immunofluorescence (C). Fluorescent density  $\pm$  SEM was plotted from three independent experiments and based on > 100 cells found in eight or more randomly chosen microscopic fields.

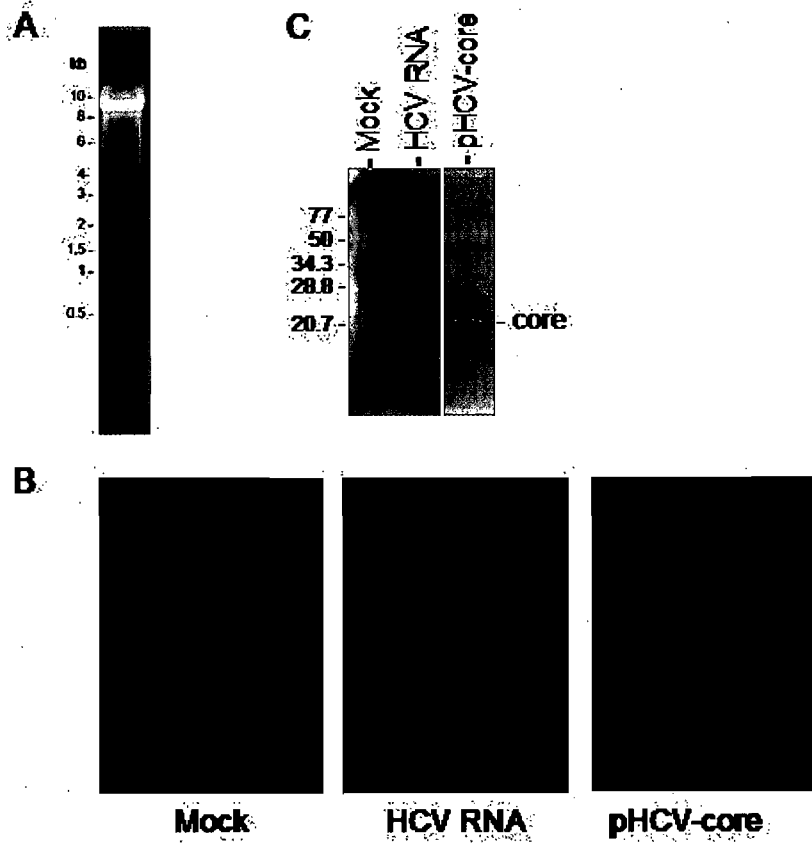


Fig. 1

575-CUCGCUUCUCUUCU-3' - 3'-UCUU/CUUUCUCUUCU-549  
 GAGCAAGACGAAGAG AAGAAGAAAGAGCAACC

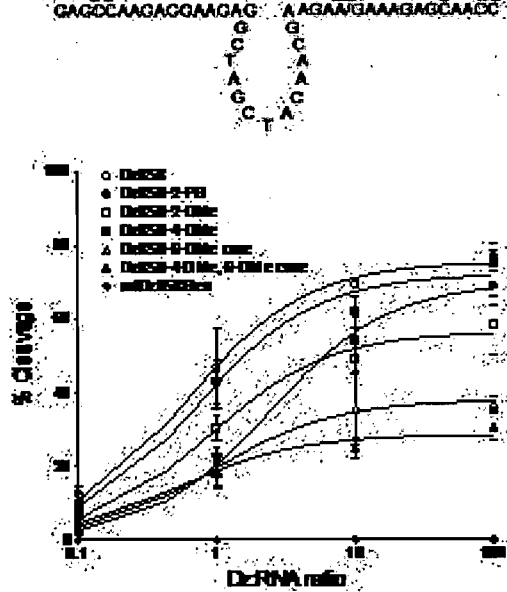


Fig. 2

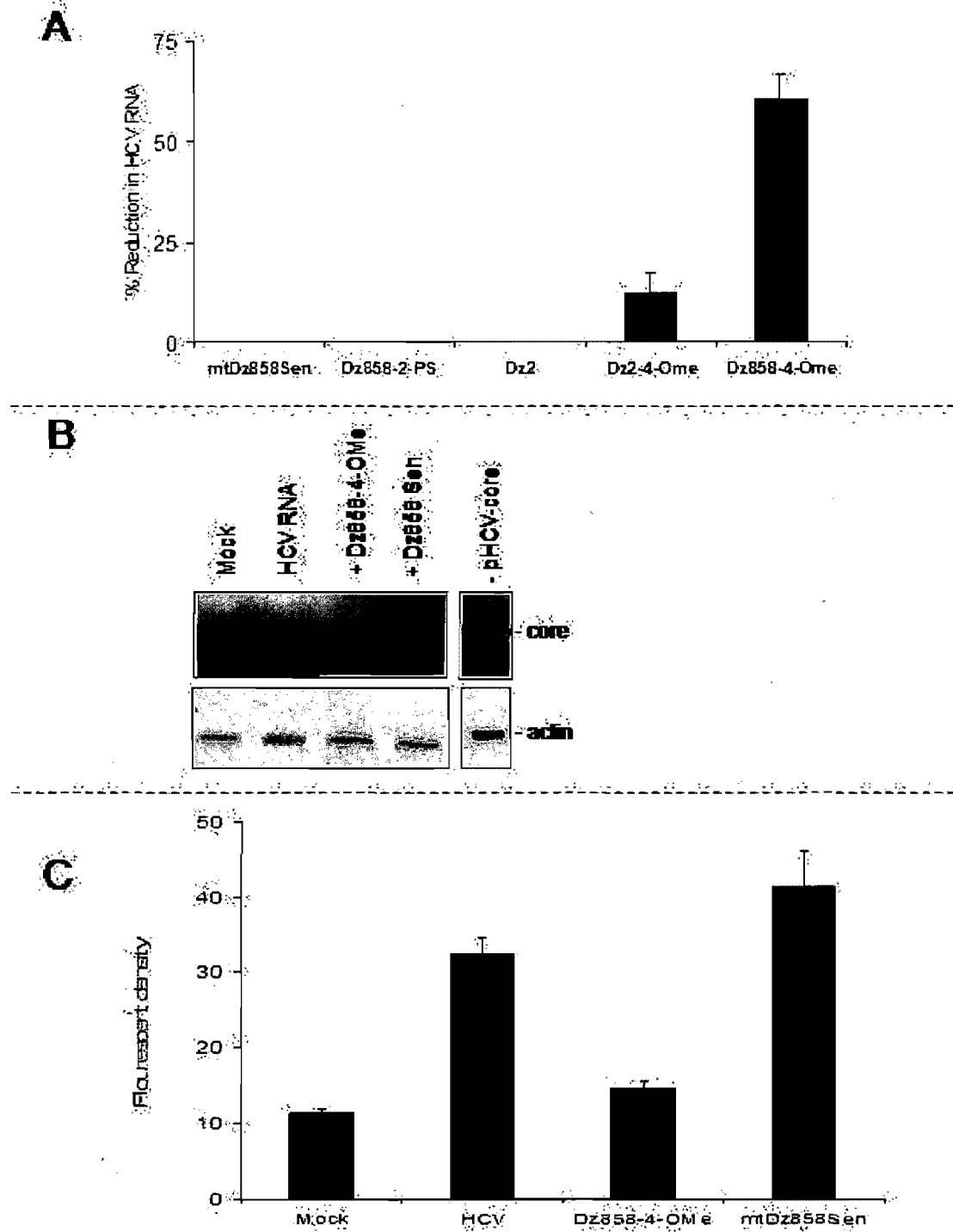


Fig. 3

## Discussion

Les désoxyribozymes semblent les meilleurs candidats pour abolir l'ARN du VHC car ils possèdent une bonne activité catalytique, une bonne résistance aux nucléases, une bonne spécificité et qu'ils sont faciles à synthétiser. Afin d'élaborer des désoxyribozymes efficaces il est important de cibler des régions conservées du génome viral afin d'éviter que des mutations permettent l'apparition d'une population résistante au traitement. Les régions 5'-RNC et 3'-RNC sont très conservées entre les génotypes (Bukh *et al.*, 1992; Simmonds, 2004). Ensuite, la région encodant la capsid est la plus conservée des séquences codantes, mais les régions encodant les protéines NS3 et NS5B sont aussi relativement bien conservées (Simmonds, 2004). Toutes ces régions constituent ainsi des cibles potentielles pour de nouveaux antiviraux.

La région de la capsid est une cible attirante car la coupure de sa séquence permet de prévenir la synthèse de toutes les protéines virales. La protéine de la capsid possède également plusieurs caractéristiques intéressantes. En plus de sa fonction de structure dans la formation de la nucléocapsid virale, il a été démontré que la protéine de la capsid régule l'expression de plusieurs gènes cellulaires (Suzuki *et al.*, 1999), modifie le cycle cellulaire (Honda *et al.*, 2000), affecte plusieurs voies apoptotiques (Ray *et al.*, 1997; Marusawa *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2000) et est impliquée dans le développement de carcinome (Moriya *et al.*, 1998). La conception d'un médicament qui abolirait sa synthèse empêcherait donc la production de particules virales et les effets néfastes associés à cette protéine. De plus, sa grande conservation nucléotidique permet de la cibler facilement. Pour toutes ces raisons, notre objectif initial fut de dessiner une librairie de désoxyribozymes contre l'ARN encodant la capsid virale.

La première étape du projet a consisté à identifier les régions de l'ARN de la capsid qui sont des cibles potentielles pour les désoxyribozymes. Il a été estimé que seulement 20% du génome est accessible à la liaison des antisens (Nielsen, 2000a). Ce manque

d'accès s'explique en partie par le repliement bidimensionnel et tridimensionnel de l'ARN qui empêche la liaison des molécules à leur cible. Plusieurs méthodes sont disponibles pour identifier les régions susceptibles: la cartographie par la sensibilité à la RNase H, l'empreinte à la RNase T1, l'utilisation d'une librairie de désoxyribozymes et l'étude du repliement de l'ARN par la bioinformatique (Cairns *et al.*, 1999; Sohail *et al.*, 1999; Sohail and Southern, 2001). La méthode SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (Tuerk *et al.*, 1990; Ellington *et al.*, 1990) pourrait constituer une autre façon d'obtenir des Dz très efficaces. Cette méthode est utilisée pour sélectionner les aptamères, mais elle a également été appliquée avec succès aux Rz (Pan *et al.*, 2001). Une librairie d'ARN contre le génome du VHB a été soumise à plusieurs rondes de sélection afin de faire ressortir les meilleures molécules ayant le plus d'affinité avec leur cible. Quatre rondes de sélection ont permis d'augmenter l'affinité de liaison de 3 000 fois. Les séquences sélectionnées ont ensuite été synthétisées sous forme de Rz. Ces Rz avaient une efficacité de coupure nettement supérieure à la normale, soit  $1 \times 10^6$  ( $M^{-1}min^{-1}$ ). Cette stratégie pourrait donc permettre de synthétiser de très bons Dz contre le VHC. Cependant la meilleure façon d'obtenir les Dz les plus efficaces demeure l'utilisation d'une librairie de Dz ciblant tous les sites de coupure présents dans le génome ciblé. Plusieurs rondes de sélections pourraient permettre d'isoler les molécules les plus efficaces. Ensuite, les longueurs de bras optimales devraient être déterminées.

Nous avons choisi d'étudier le repliement de l'ARN car cette méthode est beaucoup plus rapide que l'analyse de coupure sur le génome viral entier. Cette méthode peut cependant avoir une faible efficacité quant au nombre de molécules efficaces identifiées (Bergeron and Perreault, 2002). Cependant, des études ont démontré que le repliement de l'ARN du VHC influence l'accessibilité des antisenses à leur cibles sur l'ARN viral, ainsi l'analyse du repliement semble une méthode appropriée pour le génome du VHC (Smith *et al.*, 2002a; Martinand-Mari *et al.*, 2003a). Un bon nombre de programmes sont disponibles pour aider à prédire le repliement de l'ARN. Le plus renommé est le programme Mfold de Zuker (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2000; Zuker, 2003). Cette méthode est basée sur des

études de thermodynamique en utilisant la séquence d'ARN pour déterminer la conformation ayant la meilleure valeur énergétique. La séquence nucléotidique d'une molécule d'ARN contient l'information nécessaire à sa conformation tridimensionnelle. Cet algorithme calcule l'énergie entre chaque liaison nucléotidique possible (Zuker and Stiegler, 1981). Il ajoute un nucléotide à la fois dans la séquence, ce qui fait que la taille de la séquence à analyser peut être limitante. Le programme détermine ensuite la structure finale contenant le minimum d'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ). D'autres programmes tels que Vienna RNA Package (Hofacker *et al.*, 2002), RNAdecoder (Pedersen *et al.*, 2004) et Pfold (Goldman *et al.*, 1996) incluent dans leurs analyses des alignements de séquences. Ces alignements permettent, en théorie, d'obtenir une structure plus réaliste, surtout pour les virus ARN. Néanmoins, une étude comparative a déterminé que Vienna et Mfold sont les meilleurs programmes pour prédire correctement les cinq structures secondaires reconnues du VHC (Pedersen *et al.*, 2004). Les structures contenues dans la région 5'-RNC ont été préalablement identifiées par la programme Mfold et des digestions à la RNase (Brown *et al.*, 1992), par des études de mutations (Honda *et al.*, 1996b; Honda *et al.*, 1999) ainsi que par cristallographie (Kieft *et al.*, 2002a; Lukavsky *et al.*, 2003b). Les régions du VHC qui contiennent des structures secondaires particulièrement conservées sont disponibles sur internet (Turner, 2004). Plusieurs équipes ont donc analysé le génome du VHC pour tenter d'y trouver les structures conservées (Tuplin *et al.*, 2002a; Turner *et al.*, 2004; Tuplin *et al.*, 2004a). Ces études ont utilisé une combinaison d'analyses phylogéniques et thermodynamiques pour identifier les boucles dans l'ARN. Des études mutationnelles ont aussi été réalisées afin de mesurer la variabilité dans les sites synonymes. L'équipe de Simmonds avait préalablement démontré que la conservation nucléotidique d'une région peut être expliquée par les contraintes imposées par les structures secondaires de l'ARN qui sont essentielles à son bon fonctionnement (Simmonds and Smith, 1999). Ces études sur les mutations ont permis d'identifier quelques boucles dans les régions de la capsid et de la polymérase virale. Ces résultats sont intéressants mais la conservation nucléotidique ne s'explique pas uniquement par les contraintes du repliement de l'ARN, notamment la

conservation nucléotidique de la capsidie s'explique en grande partie par la présence de la protéine F dans cette région. Ces trois études ont permis d'identifier quelques structures conservées; malheureusement aucune des structures identifiées ne correspond aux trois régions de la capsidie que nous avons trouvées par Mfold (Figure 7). Cependant, ces études ont identifiées deux des quatre régions que nous avons découvertes dans la polymérase virale (Figure 16).

L'étude du repliement à l'aide du programme Mfold génère plusieurs structures de repliement. Une vingtaine de structures a été analysée afin d'identifier les régions qui ont la plus grande probabilité d'être simple brin. Un exemple de repliement est illustré à la figure 7. Ensuite, les boucles ont été analysées pour identifier des jonctions purine-pyrimidine ciblées par le Dz '10-23'. Cette méthode nous a permis de dessiner trois désoxyribozymes contre l'ARN de la capsidie virale.

L'efficacité des désoxyribozymes a d'abord été évaluée dans un système biochimique. Cette première étape permet de cribler les molécules qui ont le plus de potentiel. L'efficacité de coupure de plusieurs désoxyribozymes a été évaluée contre un ARN de 976 nt correspondant à la région 5'-RNC et à la capsidie. Cet ARN a été marqué radioactivement au  $^{32}\text{P}$  afin de permettre sa visualisation sur gel et d'évaluer l'efficacité de coupure des désoxyribozymes.  $K_m$  représente l'affinité du Dz pour son substrat d'ARN. Le paramètre  $k_{cat}$  mesure l'activité catalytique de l'enzyme. Le ratio  $k_{cat}/K_m$  représente l'efficacité catalytique du Dz. Les désoxyribozymes effectuent directement la catalyse de leur substrat, mais requièrent généralement l'aide d'ions métalliques. L'efficacité de coupure est donc fortement influencée par la concentration de magnésium dans la réaction (Santoro *et al.*, 1997; Santoro *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2005; Unwalla *et al.*, 2006). Il est donc primordial d'évaluer l'efficacité de coupure des désoxyribozymes thérapeutiques en conditions physiologiques, ce qui est rarement le cas des publications existantes. Santoro et Joyce ont démontré que le Dz '10-23' pouvait atteindre une efficacité de  $4.5 \times 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{min}^{-1}\text{)}$ , ce qui est plus efficace que l'enzyme protéique ribonucléase A ( $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) et



que la majorité des ribozymes (Santoro *et al.*, 1997). Le Dz '10-23' semble avoir un  $k_{cat}$  d'environ  $10^4$  fois plus faible que les enzymes protéiques, mais en revanche, il possède un  $K_m$  d'environ  $10^5$  fois plus favorable. Toutes ces réactions de coupure ont toutefois été mesurées dans divers tampons à diverses températures. Santoro et Joyce rapportent que l'activité de coupure du '10-23' en condition physiologique est plutôt d'environ  $1 \times 10^8$  ( $M^{-1}min^{-1}$ ), mais les publications dans le domaine démontrent très rarement une activité supérieure à  $1 \times 10^5$  ( $M^{-1}min^{-1}$ ). Cette différence est probablement due au fait que l'équipe de Santoro utilise plusieurs rondes de sélections ainsi qu'un ARN cible de très petite taille, soit 17 nt. Nos résultats enzymatiques obtenus avec Dz858-15-15 modifié aux phosphorothioates sont donc favorables pour des conditions physiologiques. L'efficacité de Dz858-15-15 ( $5.7 \times 10^4 M^{-1}min^{-1}$ ) est supérieure à celle de Dz2-15-15 ( $2.5 \times 10^4 M^{-1}min^{-1}$ ), le meilleur Dz de l'équipe d'Oketani dirigé contre la région 5'-RNC (Oketani *et al.*, 1999). Le pourcentage de coupure d'ARN obtenu est également supérieur aux autres désoxyribozymes dirigés contre le VHC (Yu *et al.*, 2003). Nos analyses cinétiques prouvent donc que Dz858 est un excellent candidat contre le VHC. Ceci démontre que l'analyse du repliement de l'ARN à l'aide du programme Mfold a permis d'identifier un Dz efficace *in vitro*. Malgré que nos régions simple brin n'aient pas été identifiées par d'autres études sur le repliement, une équipe a confirmé que le site de coupure du Dz858 était reconnu et clivé de façon efficace par les désoxyribozymes. Leur étude avait pour but d'identifier les régions du génome du VHC susceptibles aux antisens, aux ribozymes ou aux désoxyribozymes dans le but de les breveter. Le brevet Américain No. 09/817,879 de Blatt et coll., publié sous le No. 2003/0171311 le 11 septembre 2003 indique que leur Dz portant le numéro de séquence 9597, qui coupe le même nucléotide que Dz858, est le Dz le plus efficace de leur librairie. Ce Dz coupe 92.1% de l'ARN *in vitro* après 3 h d'incubation. Leur Dz est plus court que notre Dz858 car il contient seulement sept nucléotides par bras de liaison et contient un nucléotide de différent dans sa séquence. Ils n'ont pas effectué de test d'efficacité en culture cellulaire. Une deuxième équipe a utilisé une librairie d'antisens afin d'identifier les séquences disponibles à travers le génome du VHC (Lima *et al.*,

1997b). Brièvement, un ARN contenant les 1357 premiers nucléotides du génome du VHC de génotype 2 a été analysé. Peu de molécules antisens semblent avoir été identifiées et le site de coupure de notre Dz858 n'a pas été identifié. Ce résultat s'explique en partie par le fait que les désoxyribozymes n'ont pas les mêmes exigences de coupure que les ON-AS.

L'efficacité de Dz858 a ensuite été évaluée en culture cellulaire. Au début du projet, il n'y avait pas de bon modèle pour étudier le VHC en culture cellulaire. Nous avons alors opté pour l'utilisation d'un plasmide qui encode l'ARN de la région 5'-RNC et de la capside. Cet ARN était synthétisé à l'aide du promoteur du cytomégalovirus, ce qui générait une très grande quantité d'ARN dans les cellules. Néanmoins, cette méthode nous a permis de démontrer l'efficacité du Dz858 dans deux lignées cellulaires. Les cellules 293rtTA ont été utilisées parce qu'elles ont une grande efficacité de transfection. Les cellules HuH-7 ont été utilisées parce qu'elles sont ciblées par le VHC. Le Dz858 a réduit l'ARN de  $48\% \pm 5\%$  dans les cellules 293rtTA et de  $32\% \pm 6\%$  dans les cellules HuH-7 (Trepanier *et al.*, 2006a). L'efficacité supérieure dans les cellules 293rtTA s'explique par une plus grande efficacité de transfection du Dz858 dans ces cellules. L'utilisation d'un Dz858 ayant un domaine catalytique muté indique aussi que les cellules 293rtTA ont peut être une plus grande activité RNase H que les cellules HuH-7. Même si ce système génère une quantité énorme d'ARN dans les cellules, il a permis de démontrer que Dz858 est capable de reconnaître et couper l'ARN du VHC en culture cellulaire.

Toutes les étapes précédentes avaient été réalisées avec des désoxyribozymes contenant des modifications aux phosphorothioates. Comme de plus en plus d'évidences indiquaient que ces modifications étaient toxiques, nous avons évalué la possibilité de les remplacer par d'autres modifications. Les modifications 2'-O-méthyles ont été choisies car elles ne sont pas toxiques, sont plus efficaces et ont une bonne résistance aux nucléases (Schubert *et al.*, 2003). L'équipe de Schubert avait alors publié un article qui évaluait plusieurs sortes de modifications dans les désoxyribozymes. Le Dz le plus efficace contenait des modifications 2'-O-méthyles dans les bras de liaison et dans le domaine

catalytique (Schubert *et al.*, 2003). L'ajout de modifications dans le domaine catalytique est normalement contre-indiqué car il diminue fortement l'activité catalytique (Zaborowska *et al.*, 2002). Ces modifications ont toutefois permis d'augmenter de dix fois l'efficacité du Dz de Schubert. Nous avons donc évalué si ces modifications pouvaient améliorer l'efficacité de notre Dz858. Plusieurs Dz858 ont été synthétisés avec des modifications 2'-O-méthyles dans les bras de liaison et/ou dans le domaine catalytique. Leur efficacité a ensuite été comparée aux modifications phosphorothioates dans le système biochimique contenant l'ARN marqué au  $^{32}\text{P}$  (Figure 8). L'influence de chaque modification sur l'affinité ( $K_m$ ) et l'activité catalytique ( $k_{cat}$ ) a été évaluée (article no.2). Le Dz le plus efficace est celui non modifié ( $2.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1} \pm 0.35 \text{ SEM}$ ), cependant cette molécule est plus susceptible aux nucléases et sera dégradée rapidement *in vivo*. L'ajout de phosphorothioates diminue l'efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m = 0.57 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1} \pm 0.09 \text{ SEM}$ ) principalement en raison de sa faible affinité. Les modifications 2'-O-méthyles sont normalement reconnues pour augmenter l'affinité de liaison des oligonucléotides à leur cible. Dans notre cas, l'ajout de quatre 2'-O-méthyles par bras de liaison a permis d'augmenter l'affinité ainsi que l'activité enzymatique de Dz858, générant ainsi un candidat avec une efficacité similaire à sa version non modifiée ( $2.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1} \pm 0.30 \text{ SEM}$ ), mais possédant une meilleure résistance aux nucléases cellulaires. L'ajout des 2'-O-méthyles dans le domaine catalytique, tel que performé par Schubert et coll., a malheureusement trop diminué l'efficacité de coupure de Dz858 pour qu'il soit une option thérapeutique viable ( $0.85 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1} \pm 0.13 \text{ SEM}$ ). Nous en concluons que le modèle de Schubert n'est pas universel car il ne s'applique pas à Dz858. Ces expériences ont tout de même permis de démontrer que l'ajout de quatre modifications 2'-O-méthyles dans chaque bras de Dz858 (Dz858-4-OMe) augmente l'efficacité tout en diminuant la toxicité potentielle.

Dz858-4-OMe a ensuite été évalué en culture cellulaire. Nous avons alors utilisé un système de culture cellulaire beaucoup plus représentatif d'une infection virale. Un ARN génomique complet du génotype 1b a été transfecté dans les cellules hépatiques HuH-7. Cet ARN génomique permet l'expression de protéines virales, tel que démontré par la détection

de la protéine de la capsidie par immunofluorescence et par immunobuvardage. La protéine de la capsidie du VHC est normalement constituée des 191 premiers acides aminés situés au domaine N-terminal du génome. Plusieurs tailles de la protéine peuvent être détectées sur gel de polyacrylamide (16-23 kDa). Ces différentes tailles de la protéine influencent sa localisation cellulaire. La protéine de 191 acides aminés possède une taille moléculaire de 23 kDa (p23). La forme mature de la protéine de la capsidie retrouvée dans les virions du sérum de patients infectés est de 21 kDa (Yasui *et al.*, 1998). Cette protéine de 21 kDa (p21) est générée suite à la coupure des acides aminés 174 à 191 de la protéine p23 (Santolini *et al.*, 1994; Yasui *et al.*, 1998). Nos résultats d'immunobuvardage indiquent que notre système génère la protéine mature de 21 kDa. Ces résultats démontrent que notre système représente un ARN génomique fonctionnel. Cet ARN pleine longueur est beaucoup plus représentatif du génome viral infectieux qu'un petit fragment de 976 nt. Sa demie-vie a été estimée à 9 h (Figure 13).

Ce modèle a été utilisé pour comparer l'efficacité de Dz858-4-OMe avec le Dz858 modifié aux phosphorothioates (Dz858-PS). Comme contrôle négatif nous avons utilisé un Dz contenant un domaine catalytique muté et des bras de liaison contenant une séquence inversée (mtDz858Sen). Ce Dz est un contrôle négatif par excellence car il ne peut ni reconnaître ni couper l'ARN du VHC.

Plusieurs régimes d'administration ont été utilisés pour évaluer l'efficacité de Dz858-4-OMe. D'abord, le Dz a été transfecté 6 h avant l'ARN viral afin d'évaluer s'il peut prévenir l'infection initiale de la cellule. Ce régime permet d'évaluer si Dz858-4-OMe pourrait être utilisé en prophylaxie. Ensuite, l'efficacité de Dz a été évaluée en le cotransfectant avec l'ARN viral. Finalement, le Dz a été transfecté dans des cellules qui contenaient déjà l'ARN viral afin d'évaluer s'il peut détruire l'ARN viral dans une cellule déjà infectée. Ce dernier régime permet d'évaluer si Dz858-4-OMe a le potentiel de traiter un patient infecté. La réduction d'ARN viral a été quantifiée par PCR en temps réel (Figure 9).

L'administration d'une quantité aussi faible que 23,4 nM a été suffisante pour détruire  $63\% \pm 2,7$  SEM de l'ARN viral dans les trois régimes (Figure 10A). Le pourcentage de coupure obtenue par cotransfection est légèrement plus élevé. Ce résultat s'explique par le fait que les cellules cotransfectées ont une plus grande probabilité de recevoir à la fois l'ARN et le Dz. Lorsque les deux transfections sont séparées, plusieurs cellules vont recevoir soit l'ARN, soit le Dz. L'efficacité du Dz est donc sous-estimée. Il est également possible que l'efficacité de coupure en cotransfection soit causée par une coupure de l'ARN avant la transfection dans les cellules.

Afin d'évaluer le potentiel de Dz858-4-OMe nous avons comparé son efficacité à celle de Dz858-PS et de Dz2. Dz2 a été publié par l'équipe d'Oketani et cible la région 5'-RNC du VHC. Il contient deux modifications phosphorothioates par bras de liaison (Oketani *et al.*, 1999). L'équipe d'Oketani a démontré que Dz2 peut réduire de 55% l'expression de la luciférase lorsqu'elle est exprimée par l'IRES du VHC. Dans notre système Dz2 réduit de seulement  $11,1\% \pm 1$  SEM la quantité d'ARN génomique du VHC lorsqu'il est transfecté avant l'ARN viral. Il n'a aucune efficacité dans les cellules déjà infectées ou en co-addition. La différence d'efficacité entre notre étude et celle d'Oketani et coll. s'explique par des variations expérimentales. Premièrement, le système utilisé par Oketani évaluait le pourcentage de coupure par la réduction de la luciférase alors que notre système mesure directement la quantité d'ARN viral. Deuxièmement, les agents de transfection étaient différents. Finalement, la principale différence provient des concentrations de Dz utilisées dans les deux protocoles. L'équipe d'Oketani cotransfectait 1  $\mu\text{mol/L}$  de Dz avec 0,1  $\mu\text{g}$  de plasmide. Nous avons utilisé 0,0234  $\mu\text{mol/L}$  de Dz avec 1  $\mu\text{g}$  d'ARN (Figure 10A). L'utilisation d'une très petite quantité de Dz dans notre système indique que Dz858-4-OMe est très efficace et qu'il a un bon potentiel thérapeutique.

L'efficacité de Dz858-4-OMe est aussi nettement supérieure à celle de Dz858-PS. Ces deux molécules diffèrent seulement par le nombre et le type de modifications qui leur ont été ajoutées. L'ajout de quatre modifications 2'-O-méthyle a permis d'augmenter

grandement l'efficacité de notre molécule, ce qui permettra de réduire considérablement la quantité à administrer dans un patient. De plus, cette molécule est beaucoup moins toxique que la précédente.

Nous avons voulu évaluer si l'augmentation d'efficacité que nous avons obtenue avec Dz858-4-OMe peut également être obtenue avec n'importe quel Dz en remplaçant simplement ses phosphorothioates par des 2'-O-méthyles. Nous avons alors remplacé les phosphorothioates de Dz2 par quatre modifications 2'-O-méthyles. Le pourcentage de coupure de l'ARN est ainsi passé de  $3,7\% \pm 3,7$  SEM à  $18,3\% \pm 1,7$  (Figure 10A). L'ajout de 2'-O-méthyles augmente donc l'efficacité d'un Dz mais son effet n'est pas toujours aussi considérable que celui que nous avons obtenu avec Dz858-4-OMe.

L'efficacité de coupure en culture cellulaire de Dz858 peut également être comparée avec les résultats obtenus en culture cellulaire avec le ribozyme qui a été évalué en essai clinique. La compagnie Ribozyme Pharmaceuticals (Boulder, CO) avait synthétisé 15 ribozymes de type 'hammerhead' contre la région 5'-RNC du VHC. L'efficacité des ribozymes a d'abord été évaluée pour leur potentiel de réduction de la luciférase lorsqu'elle est exprimée par l'IRES du VHC. Une concentration de 100 nM a permis de réduire de 40% à 80% le niveau de luciférase (Macejak *et al.*, 2000). Leur meilleur ribozyme ne pouvait inhiber que de 20% le niveau de la luciférase à 25 nM, ce qui indique que notre Dz858-4-OMe est très prometteur. D'autant plus que nous avons démontré, à l'aide des expériences sur le Dz2 d'Oketani, que notre ARN viral est beaucoup plus représentatif que le système de luciférase. L'équipe de Ribozyme Pharmaceuticals a ensuite évalué l'efficacité des ribozymes sur un système viral répliquatif impliquant une chimère du virus de la polio et de la région 5'-RNC du VHC. Un ribozyme a diminué la répllication de la chimère de 90% à 200 nM. Ce même système a ensuite été utilisé pour évaluer l'effet des ribozymes en combinaison avec l'interféron. Une concentration de 50 U/mL d'IFN- $\alpha$  a permis d'inhiber à 94% la répllication virale (Macejak *et al.*, 2001). Le même niveau d'inhibition peut être obtenu avec cinq fois moins d'IFN- $\alpha$  lorsque 200 nM de Rz sont ajoutés. De façon

similaire, la dose de ribozyme peut être diminuée de trois fois lorsque l'IFN- $\alpha$  est utilisé à pleine dose. Tous ces résultats démontrent que l'IFN- $\alpha$  et les ribozymes ont tous deux des effets antiviraux qui peuvent agir en synergie. Ces études permettent donc d'envisager que Dz858-4-OMe soit un excellent candidat pour la combinaison avec l'IFN étant donné qu'il est plus efficace en culture cellulaire que les Rz évalués dans ces études.

Finalement, nous avons évalué si Dz858-4-OMe était suffisamment efficace pour réduire la quantité de protéines virales dans la cellule (Figure 10B). Dz858-4-OMe a été administré selon les trois régimes et les échantillons ont été analysés par immunobuvardage. Le régime de pré-addition, dans lequel Dz858-4-OMe a été administré 6 h avant l'ARN viral, a démontré une réduction significative de la protéine de la capsid de 21 kDa. Tel qu'attendu, le contrôle négatif mtDz858Sen n'a pas réduit le taux protéique. Le régime de cotransfection a permis de réduire encore plus efficacement la protéine de la capsid. Cette protéine n'a cependant pas été réduite de façon significative dans le régime de post-addition. Dans ce régime, l'ARN du VHC a synthétisé pendant 6 h une grande quantité de protéines virales avant l'ajout du Dz dans les cellules. La réduction de la protéine de la capsid n'a probablement pas été détectée en raison de la surcharge de protéines virales dans la cellule. La protéine de la capsid possède une demi-vie de plus de 9 h (Moradpour *et al.*, 1996), ce qui indique qu'une période d'incubation prolongée pourrait permettre de réduire la quantité de protéines virales et d'observer l'effet de Dz858-4-OMe. L'expérience a été répétée en extrayant les échantillons 36 h après l'ajout de la drogue au lieu de 24 h. Ce 12 h supplémentaire a été suffisant pour démontrer que Dz858-4-OMe réduit efficacement la protéine de la capsid. Dz858-4-OMe a donc réduit efficacement la protéine de la capsid dans les trois régimes d'administration différents. Cette réduction de protéines virales a également été confirmée par immunofluorescence (Figure 10C et Figure 11).

Nous avons donc démontré clairement que Dz858-4-OMe réduit efficacement l'ARN génomique du VHC ainsi que les protéines virales. Le nouveau modèle de culture

cellulaire utilise un ARN complet et fonctionnel, ce qui indique que le repliement de cet ARN doit être similaire à celui de l'ARN infectieux. Les résultats suggèrent que Dz858-4-OMe pourrait reconnaître et lier l'ARN infectieux du VHC dans un patient. La dose utilisée est de seulement 23,4 nM, cette dose a été déterminée comme étant la dose optimale en cotransfection (Figure 12). De plus, l'utilisation de Dz858-4-OMe permettrait de réduire les protéines virales et donc d'atténuer les conséquences nocives de ces protéines dans un patient. La dose utilisée est de seulement 23,4 nM, cette dose a été déterminée comme étant la dose optimale en cotransfection (Figure 12). Il est primordial d'évaluer la toxicité, la biodistribution, et l'efficacité de Dz858-4-OMe dans un modèle animal avant de prévoir son entrée en essai clinique. La toxicité sera évaluée dans des souris BALB/c qui recevront des injections intraveineuses de saline contenant de 5 à 50 fois la dose de Dz858-4-OMe. Des souris seront sacrifiées aux jours 3, 16 et 30, représentant la réponse à court, moyen et long terme. Les organes majeurs seront ensuite évalués par un pathologiste vétérinaire. Des études préliminaires de toxicité ont été effectuées en culture cellulaire (Tableau I et II). Premièrement la viabilité et la prolifération cellulaires ont été évaluées par le test MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Cette méthode est une façon simple, juste et reproductible de mesurer l'activité métabolique des cellules par l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. Une solution de MTT est solubilisée en culture cellulaire après transfection. La déshydrogénase mitochondriale des cellules viables coupe alors le MTT pour former des cristaux de formazan mauves mesurables par spectrophotométrie. La viabilité cellulaire est donc proportionnelle à la densité optique. Cette méthode est plus précise que le simple compte de cellules viables à l'aide d'un colorant de viabilité comme le bleu de trypan. Le tableau I démontre que 100 nM de Dz858-4-O-Me ne ralentit pas le métabolisme des cellules HuH-7 par rapport aux cellules contenant seulement l'agent de transfection. La toxicité a également été mesurée par l'intégrité membranaire à l'aide d'un test de la LDH (lactate déshydrogénase) (Tableau II). La LDH est un enzyme cytoplasmique qui réduit le NAD en NADH, ce dernier composé coloré peut ensuite être mesuré par spectrophotométrie. La présence de la LDH dans le



milieu extracellulaire est donc un reflet de l'intégrité membranaire. Cette méthode est beaucoup plus simple que la mesure de  $Cr^{51}$  pour évaluer la cytotoxicité de médicaments. Le tableau II indique que la transfection de Dz858-4-OMe n'augmente pas la relâche de la LDH en comparaison au contrôle transfecté. Les deux tests effectués semblent donc indiquer que Dz858-4-OMe n'engendre pas de toxicité cellulaire, mais il aurait été intéressant d'effectuer ces tests avec des doses beaucoup plus grandes. Les études de toxicité chez les animaux vont être déterminant dans l'évaluation du potentiel thérapeutique de Dz858-4-OMe, étant donné que plusieurs inhibiteurs protéiques contre le VHC ont échoués les essais cliniques en raison de leur toxicité importante.

Une expérience pilote a été effectuée pour déterminer le potentiel de coupure du Dz858 dans l'animal (Figure 14). Des échantillons de tissus ont été prélevés de neuf souris NOD-SCID 18 h après l'injection contrôle contenant les cellules 293 et l'ARN viral ou l'injection de cellules 293 contenant l'ARN viral et le Dz858-PS. Les cellules ont été injectées dans du matrigel (BD Biosciences, Mississauga, ON). Le matrigel est une substance liquide à quatre degré Celsius, mais elle polymérise à température pièce, ou lorsqu'injectée dans l'animal, pour former une matrice biologique. Cette substance a été utilisée afin de faciliter la récupération des cellules injectées dans l'animal. Une fois le matrigel récupéré, l'ARN a été extrait et mesuré par RT-PCR en temps réel. L'injection de Dz858-PS a permis de réduire l'ARN viral de  $63\% \pm 15.3$  SEM. L'analyse statistique, effectuée par un test de Student, démontre une réduction significative de l'ARN entre les échantillons contenant l'ARN et ceux contenant l'ARN et le Dz (valeur  $p = 0.033$ ). Ces expériences ont démontré que notre Dz858 est capable de couper efficacement l'ARN viral dans l'animal, fournissant ainsi une preuve de concept nécessaire pour le dépôt du brevet. Le Dz858 utilisé était modifié aux phosphorothioates, l'efficacité de coupure devrait donc être nettement supérieure avec notre Dz858-4-OMe. Des études plus exhaustives seront effectuées pour déterminer la biodistribution, la toxicité et l'efficacité de coupure contre un virus répliatif dans les souris.

La biodistribution sera évaluée dans les souris en injectant ~1-5 mg/kg de Dz858-4-OMe dans des souris BALB/c. Le sang sera collecté à 5, 15 et 30 minutes et à 1, 2, 4, 8, 24, et 48 h post-injection. La quantité de Dz858-4-OMe sera ensuite mesurée dans le sérum. Un deuxième groupe de souris sera injecté de façon similaire et euthanasié à 6, 12, 24 et 48 h. Les organes vitaux majeurs seront excisés et congelés. Des portions de foie seront traitées à la collagénase pour séparer les hépatocytes des cellules non parenchymateuse afin d'évaluer la proportion des désoxyribozymes dans le foie qui ce retrouve dans les hépatocytes. Une partie des désoxyribozymes seront marqués au P<sup>32</sup>, ce qui permettra de mesurer facilement la quantité de Dz858 et de déterminer sa distribution. La quantité de Dz858-4-OMe sera également mesurée dans les autres organes vitaux. Nous espérons qu'une majorité des Dz sera localisée dans les hépatocytes du foie.

Les résultats obtenus pour la biodistribution et la toxicité permettront de déterminer les doses à utiliser pour étudier l'efficacité de Dz858-4-OMe dans des souris contenant des hépatocytes humains. Ces tests d'efficacité seront effectués par le laboratoire du Dr Norman Kneteman qui a mis au point le modèle de souris qui répliquent le VHC (Mercer *et al.*, 2001). Si notre Dz858-4-OMe permet de réduire efficacement la charge virale dans les souris, nous pourrons alors procéder aux essais cliniques.

Il est primordial de parvenir à acheminer la plupart des désoxyribozymes au foie pour traiter le VHC. Une bonne distribution du Dz dans l'organe cible permettra de réduire la dose, le coût du traitement ainsi que les effets secondaires qui peuvent lui être associés. Il est donc important de choisir une voie d'administration qui permet d'injecter une bonne majorité des Dz au foie. Voici une liste des différents modes d'administration possibles.

L'ADN peut être injecté dans le foie des souris par des injections hydrodynamiques dans la veine de leur queue (Zhang *et al.*, 1999a). Ce procédé est utilisé dans la plupart des expériences car il permet de livrer la grande majorité des molécules au foie (Herweijer and Wolff, 2007). Cette procédure permet de transférer l'ADN dans environ 10% à 15% des

hépatocytes, mais certaines équipes ont pu obtenir jusqu'à 40% d'efficacité de transfection (Herweijer and Wolff, 2003).

L'injection intravasculaire permet de disséminer le Dz dans tout le tissu de l'organe ciblé étant donné que le système vasculaire irrigue toutes les cellules de l'organe. L'injection intravasculaire peut être systémique ou régional si elle est pratiquée dans un vaisseau qui irrigue l'organe cible. Par exemple, des molécules peuvent être administrées dans les hépatocytes du foie via la veine porte, la veine hépatique ou le conduit biliaire des rats et des souris. L'occlusion de la sortie du sang du foie et l'utilisation d'une solution hyperosmotique peuvent contribuer à augmenter l'apport au foie. L'injection intravasculaire est attirante car elle permet d'éviter d'avoir à injecter directement dans l'organe cible.

Les essais cliniques réalisés avec le Rz Heptazyme<sup>TM</sup> ont obtenus de bons résultats par une injection sous-cutanée. Étant donné que les Dz ont une plus longue demi-vie que les Rz, nous devrions obtenir des résultats similaires ou supérieurs à ceux qu'ils ont obtenus.

Plusieurs alternatives sont possibles advenant une faible distribution du Dz858-4-OMe dans foie. Les Dz pourraient être enrobés de polymères contenant des récepteurs spécifiques au foie [revue dans (Virovic *et al.*, 2005)]. Il serait aussi possible d'utiliser une pompe pour distribuer le Dz directement dans le foie. Des chercheurs ont mis au point une pompe intra-abdominale pour distribuer de la chimiothérapie spécifiquement au foie chez les patients atteint d'un cancer du foie (Kemeny *et al.*, 1987). Nous pourrions utiliser cette pompe pour distribuer les Dz directement au foie.

Hormis la livraison dans les cellules cibles, un des plus grands défis est de parvenir à éviter l'apparition de virus résistants à l'agent thérapeutique. Dû au défaut de la polymérase des virus à ARN, ces derniers ont une grande facilité à créer des mutations leur permettant d'échapper aux antiviraux. La stratégie préconisée pour pallier au problème de résistance du VIH est d'utiliser plusieurs médicaments en combinaison. Malgré ces efforts,

il est possible de retrouver des isolats de VIH qui résistent à de nombreux agents antiviraux différents. Cependant, il est important de souligner que les inhibiteurs du VIH utilisent essentiellement le même mode d'action; ils inhibent principalement les enzymes viraux. En plus, la combinaison d'antiviraux consiste souvent en l'utilisation de trois inhibiteurs du même enzyme : la transcriptase inverse (De Clercq E., 2007). Hors, il a été démontré que la mutation d'un seul acide aminé peut conférer une résistance à la majorité des inhibiteurs de l'enzyme ciblé (Quinones-Mateu *et al.*, 2008). Il suffit donc au VIH de très peu de mutations pour esquiver à un bon nombre d'antiviraux.

Il est important de noter que l'échec des traitements contre le VIH n'est probablement pas transposable au VHC, car le VIH contient un intermédiaire d'ADN qui s'insère dans le génome des cellules infectées, rendant ainsi l'éradication du VIH difficilement réalisable. Par contre, le VHC est un virus dont le cycle réplcatif est uniquement composé d'ARN, ce qui rend l'avenue d'une cure plus réaliste et l'utilisation combinée de plusieurs médicaments contre le VHC devrait aider à atteindre cet objectif (De Clercq E., 2007).

Pour l'instant peu de médicaments sont disponibles pour appliquer une telle stratégie contre le VHC, mais plusieurs inhibiteurs viraux sont en étude clinique. Il a été démontré que, tout comme le VIH, une seule mutation peut conférer la résistance à plusieurs inhibiteurs ciblant le même enzyme (Lin *et al.*, 2004a). Heureusement, ces mutations ne semblent pas affecter l'efficacité de l'IFN (Manns *et al.*, 2007). De plus, ces mutations ont souvent pour conséquence d'affecter la force du virus (Tomei *et al.*, 2005). Si chaque composé affaiblit tour à tour le virus, leurs effets combinés devraient parvenir à l'exterminer. Le meilleur moyen de remédier au problème de résistance semble donc d'utiliser des médicaments avec des mécanismes d'actions différents en combinaison afin d'obtenir un effet de synergie. Des expériences ont démontré que cette approche semble limiter l'apparition de résistance croisée (Lin *et al.*, 2004b; Tomei *et al.*, 2005; Le Pogam *et al.*, 2006). L'utilisation de molécules avec des cibles différentes, produisant des profils de

résistance distincts, devrait ainsi permettre de diminuer la charge virale de façon beaucoup plus marquée.

Un exemple de traitement envisageable pourrait être d'utiliser un Dz en combinaison avec un inhibiteur de protéase et un analogue de cyclosporine A. Cette stratégie permettrait de cibler le virus au niveau génomique, protéique et cellulaire. Il serait également préférable d'utiliser en combinaison plusieurs désoxyriboxymes qui ciblent des régions différentes du génome. La probabilité que des mutations résistantes à toutes ces cibles puissent survenir dans un même génome est alors fortement diminuée. À cet effet, la FDA a approuvé l'évaluation clinique d'une combinaison de siRNAs et de ribozymes contre le VIH (Li *et al.*, 2005). Cette stratégie permet de s'assurer de l'inhibition d'un virus qui a pu échapper à une molécule antisens. De plus, il serait important de séquencer les génomes viraux des patients avant d'entreprendre un traitement. De cette façon il est possible de choisir le meilleur traitement à offrir au patient. Il est également possible de synthétiser les antisens en fonction des quasi-espèces infectant le patient. Il est cependant primordial de s'assurer que les antisens ainsi générés ne soient pas complémentaires à des ARN cellulaires.

Il est important de souligner que les désoxyribozymes semblent une très bonne alternative de traitement contre le VHC car ils sont à la fois hautement spécifiques mais suffisamment flexibles pour être moins sensibles aux mutations que les inhibiteurs protéiques et certains autres antisens. La spécificité d'un enzyme, définie par le degré par lequel il peut discriminer entre deux substrats, peut être quantifiée par le ratio de son efficacité de catalyse des différents substrats (Fersht, 1985). Les désoxyribozymes reconnaissent leurs substrats par un appariement Watson-Crick, ce qui signifie que les guanosines (G) interagissent avec les cytosines (C) et que les adénosines (A) interagissent avec les thymidines (T) de l'ADN ou les uridines (U) de l'ARN. La paire de bases G-U, nommée wobble, est également possible dans l'ARN. Le degré de sélectivité par lequel l'enzyme reconnaît sa séquence d'ARN cible parmi les autres séquences d'ARN est

également affecté par la longueur de ses bras de liaison (Santoro *et al.*, 1998). La séquence de reconnaissance doit contenir au moins 13 à 14 bases pour être considérée comme étant unique dans les cellules humaines (Peracchi, 2004). Les études de spécificité du Dz '10-23' démontrent que ce Dz permet d'obtenir une grande spécificité ainsi qu'une grande sélectivité, mais qu'il peut également cliver des substrats possédants un faible taux de mutations.

La première étude de spécificité effectuée par Santoro et Joyce consistait à évaluer la capacité d'un Dz '10-23' à discriminer entre des substrats parfaitement complémentaires ou contenant une à deux mutations (Santoro *et al.*, 1998). Les résultats obtenus ont démontré que tous les substrats mutés avaient été coupés moins efficacement que les séquences parfaitement complémentaires. La réduction de l'efficacité de coupure était soit causée par une perte dans l'activité catalytique (réduction de  $k_{cat}$ ) ou par une réduction de l'affinité de liaison (augmentation de  $K_M$ ). Les mutations impliquant un wobble sont celles ayant le moins affecté l'efficacité de coupure. De façon générale, les mutations situées à proximité du site de coupure affectent de façon beaucoup plus marquée l'efficacité catalytique que les mutations situés vers les extrémités. Ce phénomène est probablement dû à une plus grande distorsion du site actif. Il est important de préciser que le Dz utilisé dans cette étude contenait seulement sept nucléotides par bras de liaison. Ce petit nombre de nucléotides augmente considérablement sa sensibilité aux mutations. Ils ont également démontré qu'un Dz contenant sept nucléotides par bras est de 20 à 50 fois plus sensible aux mutations ponctuelles qu'un Dz en contenant huit. Les données de cette étude semblent indiquer que notre Dz858, contenant 15 nucléotides par bras, devrait être capable de couper certaines séquences du VHC qui contiennent un petit nombre de mutations.

Une deuxième étude a évalué l'efficacité de coupure du modèle '10-23' contre différentes séquences du papillomavirus humain (Cairns *et al.*, 2000). Les résultats ont indiqué que seuls les séquences parfaitement complémentaires aux désoxyribozymes étaient coupées de façon efficace. Ils ont utilisé plusieurs séquences contenant des

mutations ponctuelles, certaines de celles-ci ont été coupées alors que d'autres non. Il faut cependant remarquer que le niveau de sensibilité de l'étude était très faible étant donné que les séquences complémentaires étaient de l'ADN et non de l'ARN. Les hybrides ADN-ADN sont moins stables et ont une efficacité de coupure réduite par rapport aux hybrides ARN-ADN (Ota *et al.*, 1998). Ils ont utilisé des cibles d'ADN car il était plus facile de synthétiser ces séquences du virus par PCR. Le manque de sensibilité de la méthode utilisée peut laisser croire que la coupure d'un certain nombre de séquences mutées n'a pu être détectée.

En résumé, le degré de sélectivité et de spécificité du modèle '10-23' en fait un candidat attrayant pour le traitement du VHC. Notre Dz858 contient 15 nucléotides par bras de liaison, ce qui le rend grandement sélectif pour le génome de l'hépatite C par rapport au génome humain. Les études mentionnées ci haut indiquent que son grand nombre de nucléotides par bras fait probablement en sorte que Dz858 soit capable de tolérer un certain nombre de mutations dans la séquence virale, lui permettant ainsi de reconnaître et couper les quelques mutations pouvant survenir dans cette région de la capsid virale. L'efficacité de coupure serait possiblement réduite, mais sa liaison à l'ARN pourrait tout de même procurer un effet dû à son activité antisens. À défaut de pouvoir évaluer l'impact réel des mutations du génome du VHC en culture cellulaire sur l'efficacité du Dz858 il est important de mentionner que plusieurs désoxyribozymes se sont avérés efficaces contre la réplication du VIH en culture cellulaire (Zhang *et al.*, 1999c; Unwalla *et al.*, 2001a; Chakraborti *et al.*, 2003b; Jakobsen *et al.*, 2007). Nous avons effectué des alignements de séquences afin de vérifier la conservation nucléotidique de la région ciblée.

D'abord, une analyse de 100 séquences du VHC contenues dans la banque de données américaine du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (disponible à [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) en septembre 2004) indiquait que la région reconnue par Dz858 était identique à 36 des 100 séquences. Les 64 autres séquences différaient par un seul nucléotide (A/G en position 12 de la séquence reconnue). Les 100 séquences d'ARN

analysées appartenait à trois sous-types différents (1b, 2 et 4). Ces résultats indiquaient donc que notre Dz858, ou sa variante contenant la mutation A/G, devraient être capable de reconnaître un grand nombre de séquences du virus.

Une analyse similaire a été effectuée en juillet 2006 à l'aide d'un BLAST effectué dans la banque de donnée Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>). Ce site est la banque de référence pour l'analyse des séquences du VHC. Les résultats ont indiqué que 26% des séquences étaient reconnues par Dz858-9-15, tout génotype confondu. La mutation A/G permettait de reconnaître 59% des séquences restantes. Les résultats variaient selon le génotype. Par exemple, Dz858 était identique à 30% des séquences des sous-types 1 et 1b, alors que 60% des séquences étaient reconnues par la mutation A/G. Dz858 était identique à 50% des séquences de génotype 2, versus 23% pour la mutation A/G. Dz858 reconnaissait 16% des génotype 4, versus 50% pour sa version mutée. Finalement, Dz858 reconnaissait seulement 5% des génotypes 5 et 6, mais sa version mutée permettait d'en reconnaître 90%. L'analyse de l'homologie de séquences par BLAST comporte cependant certains biais dû au fait que cette méthode trouve les séquences étant les plus similaire à la séquence soumise au programme. Le pourcentage de séquences reconnues par Dz858 et sa mutation A/G est donc probablement surestimé. De plus, l'analyse a été effectuée avec la séquence de Dz858-9-15, ce qui peut éliminer un certain nombre de mutations possibles.

Afin d'évaluer le potentiel de reconnaissance de Dz858-15-15 le plus réellement possible, la banque de données de Los Alamos a été utilisée de nouveau pour effectuer des alignements. Le programme d'alignement de Los Alamos permet de s'assurer d'obtenir qu'une seule fois la séquence d'un patient. Ces séquences ont des génotypes confirmés, ce qui n'est pas nécessairement le cas des séquences obtenues dans NCBI. Les alignements ont été performés en février 2008 pour les génotypes de référence de 2005 sur la séquence de la capsid (Figure 15). La région reconnue par Dz858-15-15 a ensuite été alignée et chaque nucléotide a été analysé manuellement. La majorité des sous-types a été séparée pour faciliter l'analyse. Les mutations causant l'association du Dz858 à sa cible par un



wobble sont indiquées en bleu car elles ont moins d'influence sur l'efficacité du Dz. La version mutée A/G du Dz858 est probablement préférable car elle permettrait l'association de toutes les séquences à l'aide de la cytosine ou de l'uridine. Les cytosines à cette position ont donc été indiquées en vert. Les mutations pouvant affecter la liaison du Dz858 ont été indiquées en rouge. Selon les études de spécificité précédemment effectuées sur le Dz '10-23', notre Dz858 devrait être très efficace contre le génotype 1b. Le site de coupure AU est conservé dans tous les génotypes. Une seule séquence contient une mutation GU, cette séquence devrait être coupée de façon tout aussi efficace car la purine n'est pas liée par le Dz et parce que la séquence GU est coupée à la même efficacité que AU (Cairns *et al.*, 2003). Étant donné son grand nombre de nucléotides, notre Dz858 devrait pouvoir tolérer un petit nombre de mutations dans les extrémités de ses bras de liaison. L'efficacité du Dz858 risque cependant d'être fortement affaibli contre les génotypes 2 et 5. Des séquences alternatives sont proposées, mais des études de toxicité devraient être refaites dans l'éventualité de l'utilisation de ces séquences à des fins thérapeutiques. Ces alignements indiquent donc que notre Dz858 devrait être efficace contre le génotype 1, dont les patients ont désespérément besoin de traitements alternatifs.

Nous avons également dessiné des désoxyribozymes contre la région de la polymérase virale NS5B. Cette région a été choisie pour sa relativement bonne conservation nucléotidique, quoiqu'elle soit inférieure à celle de la capsid (Simmonds, 2004). Le repliement bidimensionnel de l'ARN a été analysé pour identifier des régions de l'ARN de la polymérase qui permettent la liaison des désoxyribozymes. Étant donné que le programme Mfold ne permet pas d'analyser le repliement de l'ARN viral complet en raison de sa trop grande taille, le repliement de la séquence comprenant le nucléotide 3601 à la fin du génome a été analysé. La figure 16 représente une des structures prédites par le programme. Les boucles simple brin les plus fréquentes ont été comparées avec les alignements de séquences du génome de la polymérase afin d'identifier les régions accessibles qui sont les plus conservées possibles (Figure 18). Les alignements de séquences avaient été effectués à l'aide du programme Clustal W. Ce programme est utilisé

pour effectuer l'alignement multiple de séquences d'ADN ou de protéines. Il calcule le meilleur appariement pour les séquences choisies et les aligne de façon à pouvoir observer facilement leurs similarités et leurs différences.

Quatre désoxyribozymes ont ensuite été synthétisés et évalués dans le système biochimique (Tableau III). L'efficacité de coupure a été évaluée contre un ARN de 1803 nt correspondant à la polymérase virale (Figure 17). Cet ARN a été marqué radioactivement au  $P^{32}$  afin de permettre sa visualisation sur gel et d'évaluer l'efficacité de coupure des désoxyribozymes. Deux des quatre désoxyribozymes n'ont pas permis de détecter une coupure de l'ARN cible. Leur échec est probablement dû au manque d'accessibilité à leur cible, ce qui indique que l'analyse du repliement ne garantit pas l'identification de désoxyribozymes efficaces *in vitro* et *in vivo*. Les quatre désoxyribozymes ont été dessinés pour couper la jonction AC; cependant, il a été démontré subséquemment que cette jonction est peu efficace pour les désoxyribozymes contenant un domaine catalytique '10-23' (Cairns *et al.*, 2003). Il est donc étonnant que deux d'entre eux aient coupé leur cible de façon efficace. Il serait intéressant d'évaluer si les modifications que Cairns et coll. ont effectuées dans le modèle '10-23' pour augmenter la coupure AC pourraient augmenter l'efficacité de nos désoxyribozymes dirigés contre la polymérase. Aucune liaison AU ou GU n'est à la fois accessible et conservée dans nos quatre cibles pour en augmenter l'efficacité de coupure. Néanmoins, cette méthode nous a permis d'identifier deux désoxyribozymes, Dz8966 et Dz9019, qui reconnaissent et coupent l'ARN de la polymérase. Dz8966, contrairement à Dz858, semble plus efficace lorsque son bras en 5' est plus court (Figure 17), ce qui peut s'expliquer par le fait qu'il cible une plus petite boucle. Dz9019 est probablement le meilleur candidat contre la polymérase car il coupe de façon efficace son substrat et cible une région mieux conservée. Ces données sont cependant préliminaires car les analyses cinétiques et d'efficacité de coupure intracellulaire n'ont pas été réalisées. Il est important de noter que les Dz8607 et Dz9019 que nous avons identifiés sont localisés respectivement dans les boucles SL8376 et SL8828 identifiées dans

les études de repliement effectuées par Tuplin et coll. (Tuplin *et al.*, 2002b; Tuplin *et al.*, 2004b).

## Conclusion

Le VHC infecte plus de 123 millions d'humains dans le monde. Le traitement qui est disponible actuellement est peu efficace et très coûteux. L'utilisation de désoxyribozymes semble une alternative prometteuse. Ces molécules coupent efficacement l'ARN viral, elles sont peu dispendieuses et faciles à synthétiser. Leur demi-vie et leur pharmacocinétique peuvent être facilement augmentées à l'aide de modifications. De plus, il a été démontré que les Dz sont plus efficaces que la ribavirine en monothérapie (Xie *et al.*, 2006). L'utilisation de Dz en combinaison avec l'IFN-PEG devrait donc s'avérer plus efficace que la combinaison actuelle avec la ribavirine, tel que démontré avec les ribozymes (Macejak *et al.*, 2001). Elle permettrait aussi d'amoinrir les effets secondaires du traitement disponible actuellement.

Plus de 40% des individus infectés dans le monde possèdent le génotype 1. Ce génotype est également le plus résistant au traitement actuellement offert. Pour cette raison, nous avons synthétisé des Dz contre la région conservée de la capsidie du génotype 1b. Nous avons ainsi identifié un candidat, le Dz858-4-OMe, qui démontre une très bonne efficacité contre le génome entier du VHC en culture cellulaire. Le remplacement des phosphorothioates par des méthyles a grandement amélioré l'efficacité de la molécule tout en réduisant sa toxicité. Les études sur les animaux permettront de déterminer si ce candidat pourra être évalué en clinique.

## Bibliographie

1. Agence de la santé publique du Canada (2003) Lignes directrices de prise en charge pour l'adulte co-infecté par le VHC/VIH. [http://www.phac-aspc.gc.ca/hepc/pubs/gdhcvhivadlt-ldvhcvihadlt/comp\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/hepc/pubs/gdhcvhivadlt-ldvhcvihadlt/comp_f.html).
2. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, and Zhang QX (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12766-12771.
3. Agrawal S (1999) Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, **1489**, 53-68.
4. Alary M, Joly JR, Vincelette J, Lavoie R, Turmel B, and Remis RS (2005) Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C virus in a prospective cohort study of men who have sex with men. *Am J Public Health*, **95**, 502-505.
5. Alt M, Renz R, Hofschneider PH, and Caselmann WH (1997) Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation. *Arch Virol*, **142**, 589-599.
6. Alt M, Renz R, Hofschneider PH, Paumgartner G, and Caselmann WH (1995) Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology*, **22**, 707-717.
7. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, and Kuo G (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*, **321**, 1494-1500.
8. Amosova O, Coulter R, and Fresco JR (2006) Self-catalyzed site-specific depurination of guanine residues within gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4392-4397.
9. Andonov A and Chaudhary RK (1994) Genotyping of Canadian hepatitis C virus isolates by PCR. *J Clin Microbiol*, **32**, 2031-2034.

10. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, and Lotteau V (2005) Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis*, **25**, 93-104.
11. Appaiahgari MB and Vрати S (2007) DNAzyme-mediated inhibition of Japanese encephalitis virus replication in mouse brain. *Mol Ther*, **15**, 1593-1599.
12. AVI (2006) AVI-4065. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/gui/show/NCT00229749;jsessionid=51491116E1A7BB490AC6FDB71A567328?order=2>.
13. Baker DE (2001) Pegylated interferons. *Rev Gastroenterol Disord*, **1**, 87-99.
14. Ballas ZK, Rasmussen WL, and Krieg AM (1996) Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*, **157**, 1840-1845.
15. Bartenschlager R (1999) The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat*, **6**, 165-181.
16. Bartenschlager R, Frese M, and Pietschmann T (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*, **63**, 71-180.
17. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von WF, Blum HE, and Baumert TF (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, **278**, 41003-41012.
18. Bartosch B, Dubuisson J, and Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, **197**, 633-642.
19. Basu A, Meyer K, Ray RB, and Ray R (2002) Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes. *Virology*, **298**, 53-62.

20. Basu S, Sriram B, Goila R, and Banerjea AC (2000) Targeted cleavage of HIV-1 coreceptor-CXCR-4 by RNA-cleaving DNA-enzyme: inhibition of coreceptor function. *Antiviral Res*, **46**, 125-134.
21. Beale G, Hollins AJ, Benboubetra M, Sohail M, Fox SP, Benter I, and Akhtar S (2003) Gene silencing nucleic acids designed by scanning arrays: anti-EGFR activity of siRNA, ribozyme and DNA enzymes targeting a single hybridization-accessible region using the same delivery system. *J Drug Target*, **11**, 449-456.
22. Beames B, Chavez D, and Lanford RE (2001) GB virus B as a model for hepatitis C virus. *ILAR J*, **42**, 152-160.
23. Bellecave P, Andreola ML, Ventura M, Tarrago-Litvak L, Litvak S, and stier-Gin T (2003) Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro. *Oligonucleotides*, **13**, 455-463.
24. Bergeron LJ and Perreault JP (2002) Development and comparison of procedures for the selection of delta ribozyme cleavage sites within the hepatitis B virus. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4682-4691.
25. Bigger CB, Brasky KM, and Lanford RE (2001) DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol*, **75**, 7059-7066.
26. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, and Rouille Y (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, **80**, 6964-6972.
27. Blatt LM, Mutchnick MG, Tong MJ, Klion FM, Lebovics E, Freilich B, Bach N, Smith C, Herrera J, Tobias H, Conrad A, Schmid P, and McHutchison JG (2000) Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J Viral Hepat*, **7**, 196-202.
28. Blight KJ, Kolykhalov AA, Reed KE, Agapov EV, and Rice CM (1998) Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets. *Antivir Ther*, **3**, 71-81.

29. Blight KJ, Kolykhalov AA, and Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, **290**, 1972-1974.
30. Blight KJ, McKeating JA, and Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, **76**, 13001-13014.
31. Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, and Ramratnam B (2003) Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol*, **77**, 11531-11535.
32. Boucher M and Gruslin A (2000) Members of the Infectious Disease Committee of SOGC. SOGC Clinical Practice Guidelines: The reproductive care of women living with hepatitis C infection. *J Soc Ob Gyn Can*, 820-844.
33. Bradley DW (1985) The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *J Virol Methods*, **10**, 307-319.
34. Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, and Walewski JL (2005) The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*, **25**, 105-117.
35. Breaker RR and Joyce GF (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*, **1**, 223-229.
36. Brettler DB, Mannucci PM, Gringeri A, Rasko JE, Forsberg AD, Rumi MG, Garsia RJ, Rickard KA, and Colombo M (1992) The low risk of hepatitis C virus transmission among sexual partners of hepatitis C-infected hemophilic males: an international, multicenter study. *Blood*, **80**, 540-543.
37. Brown EA, Zhang H, Ping LH, and Lemon SM (1992) Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5041-5045.
38. Brown-Driver V, Eto T, Lesnik E, Anderson KP, and Hanecak RC (1999) Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **9**, 145-154.



39. Brummelkamp TR, Bernards R, and Agami R (2002) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
40. Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, Krieger N, Faulk K, Engle RE, Govindarajan S, Shapiro M, St CM, and Bartenschlager R (2002) Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14416-14421.
41. Bukh J, Purcell RH, and Miller RH (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4942-4946.
42. Bunka DH and Stockley PG (2006) Aptamers come of age - at last. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 588-596.
43. Büsen W and Frank P (1998). Bovine ribonucleases H. In Crouch,R.J. and Toulmé,J.J. (Eds.), *Ribonuclease H*, . INSERM, Paris, pp. 113-146.
44. Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Wang L, and Sun LQ (1999) Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nat Biotechnol*, **17**, 480-486.
45. Cairns MJ, King A, and Sun LQ (2003) Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2883-2889.
46. Cairns MJ, King A, and Sun LQ (2000) Nucleic acid mutation analysis using catalytic DNA. *Nucleic Acids Res*, **28**, E9.
47. Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A, Morand P, Goujard C, Pialoux G, Piroth L, Salmon-Ceron D, Degott C, Cacoub P, and Perronne C (2004) Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. *JAMA*, **292**, 2839-2848.
48. Chakraborti S and Banerjea AC (2003a) Identification of cleavage sites in the HIV-1 TAR RNA by 10-23 and 8-17 catalytic motif containing DNA enzymes. *Biomacromolecules*, **4**, 568-571.

49. Chakraborti S and Banerjee AC (2003b) Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol Ther*, **7**, 817-826.
50. Chevalier C, Saulnier A, Benureau Y, Flechet D, Delgrange D, Colbere-Garapin F, Wychowski C, and Martin A (2007) Inhibition of Hepatitis C Virus Infection in Cell Culture by Small Interfering RNAs. *Mol Ther*, **15**, 1452-1462.
51. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, and Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359-362.
52. Clawson GA, Miranda GQ, Sivarajah A, Xin P, Pan W, Thiboutot D, and Christensen ND (2004) Inhibition of papilloma progression by antisense oligonucleotides targeted to HPV11 E6/E7 RNA. *Gene Ther*, **11**, 1331-1341.
53. Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, and Dubuisson J (2000) Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol*, **74**, 3623-3633.
54. Costa-Mattioli M, Svitkin Y, and Sonenberg N (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, **24**, 6861-6870.
55. Courcambeck J, Bouzidi M, Perbost R, Jouirou B, Amrani N, Cacoub P, Pepe G, Sabatier JM, and Halfon P (2006) Resistance of hepatitis C virus to NS3-4A protease inhibitors: mechanisms of drug resistance induced by R155Q, A156T, D168A and D168V mutations. *Antivir Ther*, **11**, 847-855.
56. Craxi A and Licata A (2003) Clinical trial results of peginterferons in combination with ribavirin. *Semin Liver Dis*, **23 Suppl 1**, 35-46.
57. Crooke ST (2004) Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, **55**, 61-95.
58. Cummins LL, Owens SR, Risen LM, Lesnik EA, Freier SM, McGee D, Guinasso CJ, and Cook PD (1995) Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide

- hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2019-2024.
59. Da Rocha GS, Dausse E, and Toulme JJ (2004) Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 820-826.
  60. Dash BC and Banerjea AC (2004) Sequence-specific cleavage activities of DNA enzymes targeted against HIV-1 Gag and Nef regions. *Oligonucleotides*, **14**, 41-47.
  61. Dash BC, Hari Krishnan TA, Goila R, Shahi S, Unwalla H, Husain S, and Banerjea AC (1998) Targeted cleavage of HIV-1 envelope gene by a DNA enzyme and inhibition of HIV-1 envelope-CD4 mediated cell fusion. *FEBS Lett*, **431**, 395-399.
  62. Dass CR (2004) Deoxyribozymes: cleaving a path to clinical trials. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 395-397.
  63. Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, and Wakita T (2004) Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem*, **279**, 22371-22376.
  64. daz-Carroll L, Tallet B, Dausse E, Yurchenko L, and Toulme JJ (2002) Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through in vitro selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. *Biochemistry*, **41**, 5883-5893.
  65. De Clercq E. (2007) The design of drugs for HIV and HCV. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 1001-1018.
  66. De Francesco R and Migliaccio G (2005) Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, **436**, 953-960.
  67. Deforges S, Evlashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY, Bonnaud B, Diaz O, Paranhos-Baccala G, Lotteau V, and Andre P (2004) Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol*, **85**, 2515-2523.

68. Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, and Dubuisson J (1997) Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*, **71**, 697-704.
69. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain M, Kleiner DE, Mahaney K, and Hoofnagle JH (1995) Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, **123**, 897-903.
70. Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Jr., Yawn DH, McAllister HA, Jr., Reitz BA, and Nelson KE (1992) The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, **327**, 369-373.
71. Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, Rassam S, Fryden A, Reesink H, Bassendine M, Norkrans G, Cuypers T, Lelie N, Telfer P, Watson J, Weegink C, Sillikens P, and Weiland O (1996) Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *J Hepatol*, **25**, 591-598.
72. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, McIntyre N, and Simmonds P (1994) Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*, **19**, 13-18.
73. Ebhardt HA, Thi EP, Wang MB, and Unrau PJ (2005) Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 13398-13403.
74. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, and Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, **76**, 5974-5984.
75. El Awady MK, El Din NG, El Garf WT, Youssef SS, Omran MH, El AJ, and Goueli SA (2006) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus genotype 4 replication in HepG2 cells. *Cancer Cell Int*, **6**, 18.
76. Elayadi AN, Braasch DA, and Corey DR (2002) Implications of high-affinity hybridization by locked nucleic acid oligomers for inhibition of human telomerase. *Biochemistry*, **41**, 9973-9981.

77. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, and Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
78. Ellington AD and Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
79. Emilsson GM and Breaker RR (2002) Deoxyribozymes: new activities and new applications. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 596-607.
80. Evans MJ, von HT, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, and Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, **446**, 801-805.
81. Fabrizi F, Dixit V, Messa P, and Martin P (2008) Interferon monotherapy of chronic hepatitis C in dialysis patients: meta-analysis of clinical trials. *J Viral Hepat*, **15**, 79-88.
82. Ferenci P (2004) Predicting the therapeutic response in patients with chronic hepatitis C: the role of viral kinetic studies. *J Antimicrob Chemother*, **53**, 15-18.
83. Fersht A (1985). *Enzyme structure and Mechanism*. New York.
84. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
85. Flint M and McKeating JA (2000) The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol*, **10**, 101-117.
86. Flotte TR and Laube BL (2001) Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest*, **120**, 124S-131S.
87. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, and Thomas HC (2004) Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol*, **78**, 5170-5183.

88. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El KT, bdel-Wahab Y, ly Ohn ES, Anwar W, and Sallam I (2000) The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, **355**, 887-891.
89. Freier SM and Altmann KH (1997) The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4429-4443.
90. Frick DN (2007) The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol*, **9**, 1-20.
91. Fried MW (2002) Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology*, **36**, S237-S244.
92. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, and Yu J (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, **347**, 975-982.
93. Fukuda K, Umehara T, Sekiya S, Kunio K, Hasegawa T, and Nishikawa S (2004) An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 670-675.
94. Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, Hwang J, Kakiuchi N, Taira K, Shimotohno K, Kumar PK, and Nishikawa S (2000) Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem*, **267**, 3685-3694.
95. Gallo M, Montserrat JM, and Iribarren AM (2003) Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz J Med Biol Res*, **36**, 143-151.
96. Gao L, Aizaki H, He JW, and Lai MM (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol*, **78**, 3480-3488.
97. Georgopapadakou N (2007) Discontinued drugs in 2005: anti-infectives. *Expert Opin Investig Drugs*, **16**, 1-10.

98. Geyer CR and Sen D (2000) Use of intrinsic binding energy for catalysis by a cofactor-independent DNA enzyme. *J Mol Biol*, **299**, 1387-1398.
99. Gitlin L, Karelsky S, and Andino R (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, **418**, 430-434.
100. Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, and Hong W (2004) Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol*, **78**, 5288-5298.
101. Goila R and Banerjea AC (1998) Sequence specific cleavage of the HIV-1 coreceptor CCR5 gene by a hammer-head ribozyme and a DNA-enzyme: inhibition of the coreceptor function by DNA-enzyme. *FEBS Lett*, **436**, 233-238.
102. Goldman N, Thorne JL, and Jones DT (1996) Using evolutionary trees in protein secondary structure prediction and other comparative sequence analyses. *J Mol Biol*, **263**, 196-208.
103. Gonzalez-Carmona MA, Schussler S, Serwe M, Alt M, Ludwig J, Sproat BS, Steigerwald R, Hoffmann P, Quasdorff M, Schildgen O, and Caselmann WH (2006) Hammerhead ribozymes with cleavage site specificity for NUH and NCH display significant anti-hepatitis C viral effect in vitro and in recombinant HepG2 and CCL13 cells. *J Hepatol*, **44**, 1017-1025.
104. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, and Moradpour D (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, **77**, 5487-5492.
105. Gretton SN, Taylor AI, and McLauchlan J (2005) Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol*, **86**, 1415-1421.
106. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, and Rowlands DJ (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, **535**, 34-38.

107. Guo HZ, Mao Q, Li QF, Wang YM, Yu LC, and Jiang YG (2003) [Construction of the expression vectors of HDV ribozymes and their intracellular inhibiting activity against HCV RNA]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **11**, 432-435.
108. Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, and Hahn YS (2000) The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology*, **276**, 127-137.
109. Haley RW and Fischer RP (2001) Commercial tattooing as a potentially important source of hepatitis C infection. Clinical epidemiology of 626 consecutive patients unaware of their hepatitis C serologic status. *Medicine (Baltimore)*, **80**, 134-151.
110. Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, and Takaku H (2006) Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun*, **343**, 988-994.
111. Hanecak R, Brown-Driver V, Fox MC, Azad RF, Furusako S, Nozaki C, Ford C, Sasmor H, and Anderson KP (1996) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J Virol*, **70**, 5203-5212.
112. Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K, Suzuki T, Katayama T, Takebe Y, Saito I, and Miyamura T (1991) Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol*, **65**, 3015-3021.
113. Hauri AM, Armstrong GL, and Hutin YJ (2004) The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS*, **15**, 7-16.
114. He Y, Duan W, and Tan SL (2007) Emerging host cell targets for hepatitis C therapy. *Drug Discov Today*, **12**, 209-217.
115. Heintges T, Encke J, zu PJ, and Wands JR (2001) Inhibition of hepatitis C virus NS3 function by antisense oligodeoxynucleotides and protease inhibitor. *J Med Virol*, **65**, 671-680.



116. Helle F and Dubuisson J (2008) Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 100-112.
117. Herdewijn P (2000) Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **10**, 297-310.
118. Herweijer H and Wolff JA (2003) Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther*, **10**, 453-458.
119. Herweijer H and Wolff JA (2007) Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther*, **14**, 99-107.
120. Hofacker IL, Fekete M, and Stadler PF (2002) Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. *J Mol Biol*, **319**, 1059-1066.
121. Honda M, Beard MR, Ping LH, and Lemon SM (1999) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol*, **73**, 1165-1174.
122. Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, Matsushita E, Kobayashi K, Ping LH, Zhang HC, and Lemon SM (2000) Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology*, **31**, 1351-1359.
123. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, and Lemon SM (1996b) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, **222**, 31-42.
124. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, and Lemon SM (1996a) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, **222**, 31-42.
125. Hou W, Ni Q, Wo J, Li M, Liu K, Chen L, Hu Z, Liu R, and Hu M (2006a) Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by 10-23 DNazymes. *Antiviral Res*, **72**, 190-196.

126. Hou W, Wo JE, Li MW, and Liu KZ (2005) In vitro cleavage of hepatitis B virus C mRNA by 10-23 DNA enzyme. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **4**, 573-576.
127. Hou W, Wo JE, Liu KZ, Li MW, Chen LW, Hu ZR, Liu RH, and Hu MJ (2006b) [Inhibition of hepatitis B virus S gene and C gene expression by different 10-23 DNAzymes substrate-recognition domains]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **45**, 396-399.
128. Hsu HH, Donets M, Greenberg HB, and Feinstone SM (1993) Characterization of hepatitis C virus structural proteins with a recombinant baculovirus expression system. *Hepatology*, **17**, 763-771.
129. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, and McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7271-7276.
130. Huang Z, Murray MG, and Secrist JA, III (2006) Recent development of therapeutics for chronic HCV infection. *Antiviral Res*, **71**, 351-362.
131. Hutin YJ, Hauri AM, and Armstrong GL (2003) Use of injections in healthcare settings worldwide, 2000: literature review and regional estimates. *BMJ*, **327**, 1075.
132. Hwang B, Cho JS, Yeo HJ, Kim JH, Chung KM, Han K, Jang SK, and Lee SW (2004) Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus. *RNA*, **10**, 1277-1290.
133. Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K, Taira K, Kusakabe I, and Nishikawa S (2000a) The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 557-562.
134. Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, Sekiya S, Kakiuchi N, Taira K, Kusakabe I, and Nishikawa S (2000b) Analysis of aptamer binding site for HCV-NS3 protease by alanine scanning mutagenesis. *Nucleic Acids Symp Ser*, 253-254.
135. Idenix Pharmaceuticals. News release 13 July 2007. Valopicitabine Development Program Placed on Clinical Hold in the United States.  
<http://ir.idenix.com/phoenix.zhtml?c=131556&p=irol-newsArticle&ID=1025874&highlight>

136. Ilves H, Kaspar RL, Wang Q, Seyhan AA, Vlassov AV, Contag CH, Leake D, and Johnston BH (2006) Inhibition of hepatitis C IRES-mediated gene expression by small hairpin RNAs in human hepatocytes and mice. *Ann N Y Acad Sci*, **1082**, 52-55.
137. Imanishi T and Obika S (2002) [Down-regulation of a gene-expression by an antisense BNA oligonucleotide]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **120**, 85-90.
138. Infectious Disease and Immunization Committee CPS. (2006) Transfusion and risk of infection in Canada: Update 2005. *J Paediatric Child Health*, 149-153.
139. Ireson CR and Kelland LR (2006) Discovery and development of anticancer aptamers. *Mol Cancer Ther*, **5**, 2957-2962.
140. Ishida H, Li K, Yi M, and Lemon SM (2007) P21-activated kinase 1 is activated through the mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway and regulates the replication of hepatitis C virus in human hepatoma cells. *J Biol Chem*, **282**, 11836-11848.
141. Ito T, Tahara SM, and Lai MM (1998) The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol*, **72**, 8789-8796.
142. Ito T, Endo T, Sakai T, Karlsson A, and Collins LV (2005) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce dolphin neutrophil NADPH-oxidase activation in a CpG-independent but phosphorothioate backbone-dependent manner. *Dev Comp Immunol*, **29**, 583-588.
143. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, and Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, **21**, 635-637.
144. Jacobson IM, Everson GT, Gordon SC, Kauffman R, McNair L, Muir A, and McHutchison JG (2007) Interim analysis results from a Phase 2 study of telaprevir with Peginterferon alfa-2A and ribavirin in treatment-naïve subjects with hepatitis C. *Hepatology*, **46**, 315a-316a.

145. Jakobsen MR, Haasnoot J, Wengel J, Berkhout B, and Kjems J (2007) Efficient inhibition of HIV-1 expression by LNA modified antisense oligonucleotides and DNazymes targeted to functionally selected binding sites. *Retrovirology*, **4**, 29.
146. Jana S, Chakraborty C, Nandi S, and Deb JK (2004) RNA interference: potential therapeutic targets. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**, 649-657.
147. Januszkiewicz-Lewandowska D, Wysocki J, Pernak M, Nowicka K, Zawada M, Rembowska J, Lewandowski K, Mankowski P, and Nowak J (2007) Presence of hepatitis C virus (HCV)-RNA in peripheral blood mononuclear cells in HCV serum negative patients during interferon and ribavirin therapy. *Jpn J Infect Dis*, **60**, 29-32.
148. Jarczak D, Korf M, Beger C, Manns MP, and Kruger M (2005) Hairpin ribozymes in combination with siRNAs against highly conserved hepatitis C virus sequence inhibit RNA replication and protein translation from hepatitis C virus subgenomic replicons. *FEBS J*, **272**, 5910-5922.
149. Jason TL, Koropatnick J, and Berg RW (2004) Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol*, **201**, 66-83.
150. Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, and White PA (2006) High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 3019-3027.
151. Juliano RL, Alahari S, Yoo H, Kole R, and Cho M (1999) Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm Res*, **16**, 494-502.
152. Kaiser P, Niederost B, Joos B, von W, V, Opravil M, Weber R, Gunthard HF, and Fischer M (2006) Equal amounts of intracellular and virion-enclosed hepatitis C virus RNA are associated with peripheral-blood mononuclear cells in vivo. *J Infect Dis*, **194**, 1713-1723.
153. Kakiuchi N, Fukuda K, Nishikawa F, Nishikawa S, and Shimotohno K (2003) Inhibition of hepatitis C virus serine protease in living cells by RNA aptamers detected using fluorescent protein substrates. *Comb Chem High Throughput Screen*, **6**, 155-160.

154. Kanda T, Steele R, Ray R, and Ray RB (2007) Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol*, **81**, 669-676.
155. Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, and Kane M (1999) Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ*, **77**, 801-807.
156. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, and Chisari FV (2003) Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2014-2018.
157. Kato J, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa G, Takada K, Takimoto R, Sato Y, Fujikawa K, Takahashi M, Takayama T, Ikeda T, and Niitsu Y (2001) Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res*, **61**, 8697-8702.
158. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, and Wakita T (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, **125**, 1808-1817.
159. Kawasaki H and Taira K (2003) Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 700-707.
160. Kemeny N, Daly J, Reichman B, Geller N, Botet J, and Oderman P (1987) Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. A randomized trial. *Ann Intern Med*, **107**, 459-465.
161. Khachigian LM (2002) DNAzymes: cutting a path to a new class of therapeutics. *Curr Opin Mol Ther*, **4**, 119-121.
162. Khan AU (2006) Ribozyme: a clinical tool. *Clin Chim Acta*, **367**, 20-27.

163. Kieft JS, Zhou K, Grech A, Jubin R, and Doudna JA (2002b) Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nat Struct Biol*, **9**, 370-374.
164. Kieft JS, Zhou K, Grech A, Jubin R, and Doudna JA (2002a) Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nat Struct Biol*, **9**, 370-374.
165. Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Murray MG, Lau JY, and Doudna JA (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol*, **292**, 513-529.
166. Kikuchi K, Fukuda K, Umehara T, Hwang J, Kuno A, Hasegawa T, and Nishikawa S (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to domain II of HCV IRES. *Nucleic Acids Res Suppl*, 267-268.
167. Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Hwang J, Kuno A, Hasegawa T, and Nishikawa S (2003a) RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 263-270.
168. Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Hwang J, Kuno A, Hasegawa T, and Nishikawa S (2003b) Structure-inhibition analysis of RNA aptamers that bind to HCV IRES. *Nucleic Acids Res Suppl*, 291-292.
169. Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Kuno A, Hasegawa T, and Nishikawa S (2005) A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III<sub>d</sub>. *Nucleic Acids Res*, **33**, 683-692.
170. Kim JH, Paek KY, Ha SH, Cho S, Choi K, Kim CS, Ryu SH, and Jang SK (2004a) A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol*, **24**, 7878-7890.
171. Kim M, Shin D, Kim SI, and Park M (2006) Inhibition of hepatitis C virus gene expression by small interfering RNAs using a tri-cistronic full-length viral replicon and a transient mouse model. *Virus Res*, **122**, 1-10.

172. Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, and Oh JW (2004b) Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem*, **279**, 50031-50041.
173. Kirino Y and Mourelatos Z (2007) Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 347-348.
174. Koblin BA, Factor SH, Wu Y, and Vlahov D (2003) Hepatitis C virus infection among noninjecting drug users in New York City. *J Med Virol*, **70**, 387-390.
175. Koike K (2006) Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects. *J Infect Chemother*, **12**, 227-232.
176. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, and Rice CM (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, **277**, 570-574.
177. Kolykhalov AA, Feinstone SM, and Rice CM (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, **70**, 3363-3371.
178. Konishi M, Wu CH, Kaito M, Hayashi K, Watanabe S, Adachi Y, and Wu GY (2006) siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. *J Viral Hepat*, **13**, 756-761.
179. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, and Gitnick G (1993a) Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med*, **119**, 110-115.
180. Koretz RL, Brezina M, Polito AJ, Quan S, Wilber J, Dinello R, and Gitnick G (1993b) Non-A, non-B posttransfusion hepatitis: comparing C and non-C hepatitis. *Hepatology*, **17**, 361-365.
181. Korf M, Meyer A, Jarczak D, Beger C, Manns MP, and Kruger M (2007) Inhibition of HCV subgenomic replicons by siRNAs derived from plasmids with opposing U6 and H1 promoters. *J Viral Hepat*, **14**, 122-132.

182. Kossen K, Vaish NK, Jadhav VR, Pasko C, Wang H, Jenison R, McSwiggen JA, Polisky B, and Seiwert SD (2004) High-throughput ribozyme-based assays for detection of viral nucleic acids. *Chem Biol*, **11**, 807-815.
183. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, and Bartenschlager R (2006) Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, **80**, 5308-5320.
184. Krieg AM (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, **20**, 709-760.
185. Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, and Frese M (2004) Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol*, **78**, 3436-3446.
186. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, and Cech TR (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, **31**, 147-157.
187. Kruger M, Beger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, and Wong-Staal F (2000) Identification of eIF2Bgamma and eIF2gamma as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8566-8571.
188. Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, and Wong-Staal F (2001) C-SPACE (cleavage-specific amplification of cDNA ends): a novel method of ribozyme-mediated gene identification. *Nucleic Acids Res*, **29**, E94.
189. Kubo Y, Takeuchi K, Boonmar S, Katayama T, Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Bradley DW, Houghton M, Saito I, and . (1989) A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acids Res*, **17**, 10367-10372.
190. Kumar PK, Machida K, Urvil PT, Kakiuchi N, Vishnuvardhan D, Shimotohno K, Taira K, and Nishikawa S (1997) Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology*, **237**, 270-282.



191. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, and Watowich SJ (2001) Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol*, **75**, 2119-2129.
192. Kurreck J (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, **270**, 1628-1644.
193. Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, and Erdmann VA (2002) Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J Biol Chem*, **277**, 7099-7107.
194. Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Tani K, Asano S, and Taira K (1997) Comparison of the specificities and catalytic activities of hammerhead ribozymes and DNA enzymes with respect to the cleavage of BCR-ABL chimeric L6 (b2a2) mRNA. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3074-3081.
195. Lanford RE and Bigger C (2002) Advances in model systems for hepatitis C virus research. *Virology*, **293**, 1-9.
196. Lanford RE, Chavez D, Notvall L, and Brasky KM (2003) Comparison of tamarins and marmosets as hosts for GBV-B infections and the effect of immunosuppression on duration of viremia. *Virology*, **311**, 72-80.
197. Layden TJ, Mika B, and Wiley TE (2000) Hepatitis C kinetics: mathematical modeling of viral response to therapy. *Semin Liver Dis*, **20**, 173-183.
198. Le Pogam S, Jiang WR, Leveque V, Rajyaguru S, Ma H, Kang H, Jiang S, Singer M, Ali S, Klumpp K, Smith D, Symons J, Cammack N, and Najera I (2006) In vitro selected Con1 subgenomic replicons resistant to 2'-C-methyl-cytidine or to R1479 show lack of cross resistance. *Virology*, **351**, 349-359.
199. Lebedeva I and Stein CA (2001) Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 403-419.
200. Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, and Sandberg JA (2000) Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice. *Hepatology*, **32**, 640-646.

201. Lee S, Kim YS, Jo M, Jin M, Lee DK, and Kim S (2007) Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 47-52.
202. Lee WM, Polson JE, Carney DS, Sahin B, and Gale M, Jr. (2005) Reemergence of hepatitis C virus after 8.5 years in a patient with hypogammaglobulinemia: evidence for an occult viral reservoir. *J Infect Dis*, **192**, 1088-1092.
203. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Treppe C, and Inchauspe G (1998) In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood*, **91**, 3841-3849.
204. Lerat H, Shimizu YK, and Lemon SM (2000) Cell type-specific enhancement of hepatitis C virus internal ribosome entry site-directed translation due to 5' nontranslated region substitutions selected during passage of virus in lymphoblastoid cells. *J Virol*, **74**, 7024-7031.
205. Levin AA (1999) A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, **1489**, 69-84.
206. Li MJ, Kim J, Li S, Zaia J, Yee JK, Anderson J, Akkina R, and Rossi JJ (2005) Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol Ther*, **12**, 900-909.
207. Lieber A, He CY, Polyak SJ, Gretch DR, Barr D, and Kay MA (1996) Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol*, **70**, 8782-8791.
208. Lima WF, Brown-Driver V, Fox M, Hanecak R, and Bruice TW (1997a) Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J Biol Chem*, **272**, 626-638.
209. Lima WF, Brown-Driver V, Fox M, Hanecak R, and Bruice TW (1997b) Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded

- hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J Biol Chem*, **272**, 626-638.
210. Lin C, Lin K, Luong YP, Rao BG, Wei YY, Brennan DL, Fulghum JR, Hsiao HM, Ma S, Maxwell JP, Cottrell KM, Perni RB, Gates CA, and Kwong AD (2004a) In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem*, **279**, 17508-17514.
211. Lin HH, Kao JH, Hsu HY, Ni YH, Chang MH, Huang SC, Hwang LH, Chen PJ, and Chen DS (1995) Absence of infection in breast-fed infants born to hepatitis C virus-infected mothers. *J Pediatr*, **126**, 589-591.
212. Lin K, Kwong AD, and Lin C (2004b) Combination of a hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor and alpha interferon synergistically inhibits viral RNA replication and facilitates viral RNA clearance in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4784-4792.
213. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, and Rice CM (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623-626.
214. Liu M, Ding H, Zhao P, Qin ZL, Gao J, Cao MM, Luan J, Wu WB, and Qi ZT (2006) RNA interference effectively inhibits mRNA accumulation and protein expression of hepatitis C virus core and E2 genes in human cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2049-2055.
215. Liu Y, Chen Z, and He N (1997) [Inhibition of hepatitis C virus by antisense oligodeoxynucleotide in vitro]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **77**, 567-570.
216. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, and McKeating JA (2004) Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 10149-10154.
217. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, and Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-113.

218. Lu L, Nakano T, Orito E, Mizokami M, and Robertson BH (2001) Evaluation of accumulation of hepatitis C virus mutations in a chronically infected chimpanzee: comparison of the core, E1, HVR1, and NS5b regions. *J Virol*, **75**, 3004-3009.
219. Lu L, Pilot-Matias TJ, Stewart KD, Randolph JT, Pithawalla R, He W, Huang PP, Klein LL, Mo H, and Molla A (2004) Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 2260-2266.
220. Lu ZX, Ye M, Yan GR, Li Q, Tang M, Lee LM, Sun LQ, and Cao Y (2005) Effect of EBV LMP1 targeted DNAzymes on cell proliferation and apoptosis. *Cancer Gene Ther*, **12**, 647-654.
221. Ludwig J, Blaschke M, and Sproat BS (1998) Extending the cleavage rules for the hammerhead ribozyme: mutating adenosine15.1 to inosine15.1 changes the cleavage site specificity from N16.2U16.1H17 to N16.2C16.1H17. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2279-2285.
222. Lukavsky PJ, Kim I, Otto GA, and Puglisi JD (2003a) Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat Struct Biol*, **10**, 1033-1038.
223. Lukavsky PJ, Kim I, Otto GA, and Puglisi JD (2003b) Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat Struct Biol*, **10**, 1033-1038.
224. Lyngstadaas SP, Risnes S, Sproat BS, Thrane PS, and Prydz HP (1995) A synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel in vivo. *EMBO J*, **14**, 5224-5229.
225. Lysik MA and Wu-Pong S (2003) Innovations in oligonucleotide drug delivery. *J Pharm Sci*, **92**, 1559-1573.
226. Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von C, I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA, and Blatt LM (2000) Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology*, **31**, 769-776.

227. Macejak DG, Jensen KL, Pavco PA, Phipps KM, Heinz BA, Colacino JM, and Blatt LM (2001) Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral Hepat*, **8**, 400-405.
228. Manns MP, Foster GR, Rockstroh JK, Zeuzem S, Zoulim F, and Houghton M (2007) The way forward in HCV treatment--finding the right path. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 991-1000.
229. Marcellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, Kilani A, Areias J, Auperin A, Benhamou JP, Degott C, and Erlinger S (1997) Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med*, **127**, 875-881.
230. Martinand-Mari C, Lebleu B, and Robbins I (2003b) Oligonucleotide-based strategies to inhibit human hepatitis C virus. *Oligonucleotides*, **13**, 539-548.
231. Martinand-Mari C, Lebleu B, and Robbins I (2003a) Oligonucleotide-based strategies to inhibit human hepatitis C virus. *Oligonucleotides*, **13**, 539-548.
232. Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, and Shimotohno K (1999) Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol*, **73**, 4713-4720.
233. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, and Turner DH (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**, 911-940.
234. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, and Zamore PD (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, **123**, 607-620.
235. Mayer G and Jenne A (2004) Aptamers in research and drug development. *BioDrugs*, **18**, 351-359.
236. Mayo MJ (2003) Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci*, **325**, 135-148.

237. McCaffrey AP, Meuse L, Karimi M, Contag CH, and Kay MA (2003) A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology*, **38**, 503-508.
238. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, and Albrecht JK (1998a) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, **339**, 1485-1492.
239. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, and Albrecht JK (1998b) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, **339**, 1485-1492.
240. McHutchison JG, Patel K, Pockros P, Nyberg L, Pianko S, Yu RZ, Dorr FA, and Kwoh TJ (2006) A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, **44**, 88-96.
241. Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, and Simmonds P (1995) Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*, **76** ( Pt 10), 2493-2507.
242. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, and Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*, **7**, 927-933.
243. Meyer K, Basu A, Saito K, Ray RB, and Ray R (2005) Inhibition of hepatitis C virus core protein expression in immortalized human hepatocytes induces cytochrome c-independent increase in Apaf-1 and caspase-9 activation for cell death. *Virology*, **336**, 198-207.
244. Mizutani T, Kato N, Hirota M, Sugiyama K, Murakami A, and Shimotohno K (1995) Inhibition of hepatitis C virus replication by antisense oligonucleotide in culture cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**, 906-911.

245. Moradpour D, Englert C, Wakita T, and Wands JR (1996) Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*, **222**, 51-63.
246. Moradpour D, Penin F, and Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 453-463.
247. Morbitzer M and Herget T (2005) Expression of gastrointestinal glutathione peroxidase is inversely correlated to the presence of hepatitis C virus subgenomic RNA in human liver cells. *J Biol Chem*, **280**, 8831-8841.
248. Moreno L, Quereda C, Moreno A, Perez-Elias MJ, Antela A, Casado JL, Dronda F, Mateos ML, Barcena R, and Moreno S (2004) Pegylated interferon alpha2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS*, **18**, 67-73.
249. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, and Koike K (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*, **4**, 1065-1067.
250. Nadal A, Robertson HD, Guardia J, and Gomez J (2003) Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting. *J Gen Virol*, **84**, 1545-1548.
251. Nakagawa S, Umehara T, Matsuda C, Kuge S, Sudoh M, and Kohara M (2007) Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**, 882-888.
252. Nakashima K, Kashiwagi S, Hayashi J, Noguchi A, Hirata M, Kajiyama W, Urabe K, Minami K, and Maeda Y (1992) Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol*, **136**, 1132-1137.
253. Napoli C, Lemieux C, and Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.

254. Neary CL and Cho-Chung YS (2001) Nuclear translocation of the catalytic subunit of protein kinase A induced by an antisense oligonucleotide directed against the R1alpha regulatory subunit. *Oncogene*, **20**, 8019-8024.
255. Ng TI, Mo H, Pilot-Matias T, He Y, Koev G, Krishnan P, Mondal R, Pithawalla R, He W, Dekhtyar T, Packer J, Schurdak M, and Molla A (2007) Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology*, **45**, 1413-1421.
256. Nielsen PE (2000b) Antisense peptide nucleic acids. *Curr Opin Mol Ther*, **2**, 282-287.
257. Nielsen PE (2000a) Peptide nucleic acids: on the road to new gene therapeutic drugs. *Pharmacol Toxicol*, **86**, 3-7.
258. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, and Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**, 1497-1500.
259. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Bevitt DJ, and Toms GL (2004) Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. *J Gen Virol*, **85**, 1497-1507.
260. NIH Expert Panel (2002) NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consensus State Sci Statements*, **19**, 1-46.
261. Nishikawa F, Funaji K, Fukuda K, and Nishikawa S (2004) In vitro selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. *Oligonucleotides*, **14**, 114-129.
262. Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, and Nishikawa S (2003) Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1935-1943.
263. Nouri-Aria KT, Sallie R, Mizokami M, Portmann BC, and Williams R (1995) Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. *J Pathol*, **175**, 77-83.



264. Oketani M, Asahina Y, Wu CH, and Wu GY (1999) Inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression by a DNA ribonuclease. *J Hepatol*, **31**, 628-634.
265. Opalinska JB, Kalota A, Chattopadhyaya J, Damha M, and Gewirtz AM (2006) Nucleic acid therapeutics for hematologic malignancies--theoretical considerations. *Ann N Y Acad Sci*, **1082**, 124-136.
266. Orum H and Wengel J (2001) Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr Opin Mol Ther*, **3**, 239-243.
267. Ota N, Warashina M, Hirano K, Hatanaka K, and Taira K (1998) Effects of helical structures formed by the binding arms of DNAzymes and their substrates on catalytic activity. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3385-3391.
268. Pan WH and Clawson GA (2006) Antisense applications for biological control. *J Cell Biochem*, **98**, 14-35.
269. Pan WH, Devlin HF, Kelley C, Isom HC, and Clawson GA (2001) A selection system for identifying accessible sites in target RNAs. *RNA*, **7**, 610-621.
270. Patil SD, Rhodes DG, and Burgess DJ (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J*, **7**, E61-E77.
271. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, and Zitzmann N (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6104-6108.
272. Pedersen JS, Meyer IM, Forsberg R, Simmonds P, and Hein J (2004) A comparative method for finding and folding RNA secondary structures within protein-coding regions. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4925-4936.
273. Peracchi A (2004) Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes. *Rev Med Virol*, **14**, 47-64.

274. Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, and Levey AS (1991) Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med*, **325**, 454-460.
275. Perz JF, Farrington LA, Pecoraro C, Hutin YJF, and Armstrong GL. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. Boston, MA, USA. 2008. *Conference Proceeding*.
276. Petracca R, Falugi F, Galli G, Norais N, Rosa D, Campagnoli S, Burgio V, Di SE, Giardina B, Houghton M, Abrignani S, and Grandi G (2000) Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol*, **74**, 4824-4830.
277. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, and Bartenschlager R (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, **76**, 4008-4021.
278. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, and Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938-941.
279. Pottage JC, Jr., Lawitz E, Mazur D, Wyles D, Vargas H, Ghalib R, Gugliotti R, Donohue M, and Robison H (2007) Short-term antiviral activity and safety of ACH-806 (GS-9132), an NS4A antagonist, in HCV genotype 1 infected individuals. *J Hepatology*, **46**, S294-S295.
280. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, and Albrecht J (1998) Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*, **352**, 1426-1432.
281. Prabhu R, Garry RF, and Dash S (2006) Small interfering RNA targeted to stem-loop II of the 5' untranslated region effectively inhibits expression of six HCV genotypes. *Virol J*, **3**, 100.
282. Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, and Gage PW (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, **557**, 99-103.

283. Public Health Agency of Canada. A study to characterize the epidemiology of hepatitis C infection in Canada, 2002. Final report, 2004. Health Canada. 2004. Ottawa.
284. Que-Gewirth NS and Sullenger BA (2007) Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene Ther*, **14**, 283-291.
285. Quinones-Mateu ME, Moore-Dudley DM, Jegede O, Weber J, and Arts J (2008) Viral drug resistance and fitness. *Adv Pharmacol*, **56**, 257-296.
286. Randall G, Chen L, Panis M, Fischer AK, Lindenbach BD, Sun J, Heathcote J, Rice CM, Edwards AM, and McGilvray ID (2006a) Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, **131**, 1584-1591.
287. Randall G, Grakoui A, and Rice CM (2003) Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 235-240.
288. Randall G, Panis M, Tellingheusin TL, Cooper JD, Soukhodolets KE, Lindenbach BD, Tuschl T, and Rice CM (2006b) An RNA interference screen for host cofactors of hepatitis C virus infection. *Conference Proceeding*.
289. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, and Batshaw ML (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, **80**, 148-158.
290. Ray RB, Steele R, Meyer K, and Ray R (1997) Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*, **272**, 10983-10986.
291. Ren N, Wang F, and Niu JQ (2005) [A study of 10-23 DNAzyme inhibiting the expression of hepatitis B virus genes]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **13**, 745-748.

292. Reynolds JE, Kaminski A, Carroll AR, Clarke BE, Rowlands DJ, and Jackson RJ (1996) Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA*, **2**, 867-878.
293. Richardso P, Kren BT, and Steer CJ (2002) In vivo application of non-viral vectors to the liver. *J Drug Target*, **10**, 123-131.
294. Roberts EA and Yeung L (2002) Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **36**, S106-S113.
295. Robertson DL and Joyce GF (1990) Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, **344**, 467-468.
296. Roehr B (1998) Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*, **4**, 14-16.
297. Romero-Lopez C, Barroso-DelJesus A, Puerta-Fernandez E, and Berzal-Herranz A (2005) Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method. *Biol Chem*, **386**, 183-190.
298. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, and Abrignani S (1996) A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1759-1763.
299. Ryu KJ and Lee SW (2003) Identification of the most accessible sites to ribozymes on the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Biochem Mol Biol*, **36**, 538-544.
300. Sabariegos R, Nadal A, Beguiristain N, Piron M, and Gomez J (2004) Catalytic RNase P RNA from *Synechocystis* sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon. *FEBS Lett*, **577**, 517-522.
301. Sakamoto N, Wu CH, and Wu GY (1996) Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest*, **98**, 2720-2728.

302. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, and Degen JL (1991) Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell*, **66**, 245-256.
303. Santiago FS, Lowe HC, Kavurma MM, Chesterman CN, Baker A, Atkins DG, and Khachigian LM (1999) New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nat Med*, **5**, 1438.
304. Santolini E, Migliaccio G, and La MN (1994) Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*, **68**, 3631-3641.
305. Santoro SW and Joyce GF (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4262-4266.
306. Santoro SW and Joyce GF (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry*, **37**, 13330-13342.
307. Saracco G, Olivero A, Ciancio A, Carezzi S, and Rizzetto M (2003) Therapy of chronic hepatitis C: a critical review. *Curr Drug Targets Infect Disord*, **3**, 25-32.
308. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, Wincheringer D, Zhou Y, Chu HM, Lin C, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, and Kwong AD (2007) Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology*, **132**, 1767-1777.
309. Sazani P, Gemignani F, Kang SH, Maier MA, Manoharan M, Persmark M, Bortner D, and Kole R (2002) Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol*, **20**, 1228-1233.
310. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, and Collins FS (2004) Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1892-1897.
311. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, and Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B

- type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, **21**, 5017-5025.
312. Scarselli E, Urbani A, Sbardellati A, Tomei L, De FR, and Traboni C (1997) GB virus B and hepatitis C virus NS3 serine proteases share substrate specificity. *J Virol*, **71**, 4985-4989.
  313. Schubert S, Gul DC, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, and Kurreck J (2003) RNA cleaving '10-23' DNazymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5982-5992.
  314. Schubert S and Kurreck J (2004) Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. *Curr Drug Targets*, **5**, 667-681.
  315. Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, **36**, S35-S46.
  316. Seki M and Honda Y (1995) Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: in vitro translation assay. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 1199-1204.
  317. Sekiya S, Nishikawa F, Fukuda K, and Nishikawa S (2003) Structure/function analysis of an RNA aptamer for hepatitis C virus NS3 protease. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 351-359.
  318. Selby MJ, Glazer E, Masiarz F, and Houghton M (1994) Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology*, **204**, 114-122.
  319. Semple SC, Harasym TO, Clow KA, Ansell SM, Klimuk SK, and Hope MJ (2005) Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid. *J Pharmacol Exp Ther*, **312**, 1020-1026.
  320. Sen A, Steele R, Ghosh AK, Basu A, Ray R, and Ray RB (2003) Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. *Virus Res*, **96**, 27-35.
  321. Seo MY, Abrignani S, Houghton M, and Han JH (2003) Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J Virol*, **77**, 810-812.

322. Serafino A, Valli MB, Andreola F, Crema A, Ravagnan G, Bertolini L, and Carloni G (2003) Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *J Med Virol*, **70**, 31-41.
323. Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Shapiro M, Wong DC, Purcell RH, and Yoshikura H (1998) Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol*, **79** ( Pt 6), 1383-1386.
324. Simmonds P (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*, **85**, 3173-3188.
325. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin I, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, and Widell A (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, **42**, 962-973.
326. Simmonds P and Smith DB (1999) Structural constraints on RNA virus evolution. *J Virol*, **73**, 5787-5794.
327. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, and Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.
328. Smith RM, Smolic R, Volarevic M, and Wu GY (2007) Positional effects and strand preference of RNA interference against hepatitis C virus target sequences. *J Viral Hepat*, **14**, 194-212.
329. Smith RM, Walton CM, Wu CH, and Wu GY (2002b) Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol*, **76**, 9563-9574.
330. Smith RM, Walton CM, Wu CH, and Wu GY (2002a) Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol*, **76**, 9563-9574.

331. Sohail M, Akhtar S, and Southern EM (1999) The folding of large RNAs studied by hybridization to arrays of complementary oligonucleotides. *RNA*, **5**, 646-655.
332. Sohail M and Southern EM (2001) Using oligonucleotide scanning arrays to find effective antisense reagents. *Methods Mol Biol*, **170**, 181-199.
333. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, and Lieberman J (2003) RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, **9**, 347-351.
334. Sood V, Unwalla H, Gupta N, Chakraborti S, and Banerjee AC (2007) Potent knock down of HIV-1 replication by targeting HIV-1 Tat/Rev RNA sequences synergistically with catalytic RNA and DNA. *AIDS*, **21**, 31-40.
335. Spaete RR, Alexander D, Rugroden ME, Choo QL, Berger K, Crawford K, Kuo C, Leng S, Lee C, Ralston R, and . (1992) Characterization of the hepatitis C virus E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology*, **188**, 819-830.
336. Sriram B and Banerjee AC (2000) In vitro-selected RNA cleaving DNA enzymes from a combinatorial library are potent inhibitors of HIV-1 gene expression. *Biochem J*, **352 Pt 3**, 667-673.
337. Steele D, Kertsburg A, and Soukup GA (2003) Engineered catalytic RNA and DNA : new biochemical tools for drug discovery and design. *Am J Pharmacogenomics*, **3**, 131-144.
338. Stein CA (1996) Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity. *Trends Biotechnol*, **14**, 147-149.
339. Stephenson ML and Zamecnik PC (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 285-288.
340. Stuyver L, Claeys H, Wyseur A, Van AW, De BH, Uytendaele S, Beckers J, Matthijs D, Leroux-Roels G, Maertens G, and De PM (1996) Hepatitis C virus in a hemodialysis unit: molecular evidence for nosocomial transmission. *Kidney Int*, **49**, 889-895.



341. Sulkowski MS (2007) Specific targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Curr Gastroenterol Rep*, **9**, 5-13.
342. Summerton J and Weller D (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **7**, 187-195.
343. Sun S (2000) Technology evaluation: SELEX, Gilead Sciences Inc. *Curr Opin Mol Ther*, **2**, 100-105.
344. Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, and Miyamura T (1999) Processing and functions of Hepatitis C virus proteins. *Intervirology*, **42**, 145-152.
345. Swiatkowska A, Dutkiewicz M, and Ciesiolka J (2007) Structural features of target RNA molecules greatly modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribozymes. *Biochemistry*, **46**, 5523-5533.
346. Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, Seeff LB, Hoofnagle JH, Jackson DR, April M, Barker LF, and Pineda-Tamondong G (1978) Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet*, **1**, 463-466.
347. Takada N, Takase S, Takada A, and Date T (1993) Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol*, **17**, 277-283.
348. Takahashi H, Abe T, Takai K, and Takaku H (2000) Inhibition of influenza virus RNA (PB2 mRNA) expression by a modified DNA enzyme. *Nucleic Acids Symp Ser*, 287-288.
349. Takahashi H, Hamazaki H, Habu Y, Hayashi M, Abe T, Miyano-Kurosaki N, and Takaku H (2004) A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett*, **560**, 69-74.
350. Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Hidajat R, Tanaka M, Mizuta H, and Hotta H (2004) Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, **48**, 591-598.

351. Tallet-Lopez B, daz-Carroll L, Chabas S, Dausse E, Staedel C, and Toulme JJ (2003) Antisense oligonucleotides targeted to the domain III<sub>d</sub> of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation. *Nucleic Acids Res*, **31**, 734-742.
352. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, and Shimotohno K (1995) A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 744-749.
353. Tawaraya H, Ohkoshi S, Kuwana K, Watanabe M, Kamimura T, and Asakura H (1995) Epidemiologic survey and genetic analysis of endemic hepatitis C virus infection in a Japanese town with a high prevalence of hepatitis B virus carriers. *J Med Virol*, **45**, 367-372.
354. Taylor MC, Greig PD, Detsky AS, McLeod RS, Abdoh A, and Krahn MD (2002) Factors associated with the high cost of liver transplantation in adults. *Can J Surg*, **45**, 425-434.
355. Taylor NR, Kaplan BE, Swiderski P, Li H, and Rossi JJ (1992) Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozymes have enhanced in vitro catalytic efficiency and increased stability in vivo. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4559-4565.
356. Thurner C. <http://rna.tbi.univie.ac.at/virus/>. 2004.
357. Thurner C, Witwer C, Hofacker IL, and Stadler PF (2004) Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol*, **85**, 1113-1124.
358. Tian MM, Wang F, Niu JQ, and Wang MX (2004) [Study on the cleavage activity of U1 small nuclear RNA chimeric ribozyme against HCV RNA in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **12**, 749-751.
359. Tomei L, Altamura S, Paonessa G, De FR, and Migliaccio G (2005) HCV antiviral resistance: the impact of in vitro studies on the development of antiviral agents targeting the viral NS5B polymerase. *Antivir Chem Chemother*, **16**, 225-245.

360. Tong X, Chase R, Skelton A, Chen T, Wright-Minogue J, and Malcolm BA (2006) Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res*, **70**, 28-38.
361. Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-Garcia J, Lazzarin A, Carosi G, Sasadeusz J, Katlama C, Montaner J, Sette H, Jr., Pisse S, De PJ, Duff F, Schrenk UM, and Dieterich DT (2004) Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med*, **351**, 438-450.
362. Toyoda T, Imamura Y, Takaku H, Kashiwagi T, Hara K, Iwahashi J, Ohtsu Y, Tsumura N, Kato H, and Hamada N (2000) Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett*, **481**, 113-116.
363. Trepanier J, Tanner JE, Momparler RL, Le ON, Alvarez F, and Alfieri C (2006a) Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes. *J Viral Hepat*, **13**, 131-138.
364. Trepanier JB, Tanner JE, and Alfieri C (2006b) Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection. *Antivir Ther*, **11**, 273-287.
365. Trozzi C, Bartholomew L, Ceccacci A, Biasiol G, Pacini L, Altamura S, Narjes F, Muraglia E, Paonessa G, Koch U, De FR, Steinkuhler C, and Migliaccio G (2003) In vitro selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor. *J Virol*, **77**, 3669-3679.
366. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, and Rice CM (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol*, **80**, 1734-1741.
367. Tuerk C and Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
368. Tuplin A, Evans DJ, and Simmonds P (2004b) Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol*, **85**, 3037-3047.

369. Tuplin A, Evans DJ, and Simmonds P (2004a) Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol*, **85**, 3037-3047.
370. Tuplin A, Wood J, Evans DJ, Patel AH, and Simmonds P (2002b) Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA*, **8**, 824-841.
371. Tuplin A, Wood J, Evans DJ, Patel AH, and Simmonds P (2002a) Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA*, **8**, 824-841.
372. Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Kohara M, Hasegawa T, and Nishikawa S (2005) Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 339-347.
373. Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Sekiya S, Kohara M, Hasegawa T, and Nishikawa S (2004) Designing and analysis of a potent bi-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 195-196.
374. Unwalla H and Banerjea AC (2001a) Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/Rev RNA. *Biochem J*, **357**, 147-155.
375. Unwalla H and Banerjea AC (2001b) Novel mono- and di-DNA-enzymes targeted to cleave TAT or TAT-REV RNA inhibit HIV-1 gene expression. *Antiviral Res*, **51**, 127-139.
376. Unwalla H, Chakraborti S, Sood V, Gupta N, and Banerjea AC (2006) Potent inhibition of HIV-1 gene expression and TAT-mediated apoptosis in human T cells by novel mono- and multitarget anti-TAT/Rev/Env ribozymes and a general purpose RNA-cleaving DNA-enzyme. *Antiviral Res*, **72**, 134-144.
377. Urban E and Noe CR (2003) Structural modifications of antisense oligonucleotides. *Farmaco*, **58**, 243-258.

378. Urvil PT, Kakiuchi N, Zhou DM, Shimotohno K, Kumar PK, and Nishikawa S (1997) Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem*, **248**, 130-138.
379. Vidalin O, Major ME, Rayner B, Imbach JL, Trepo C, and Inchauspe G (1996) In vitro inhibition of hepatitis C virus gene expression by chemically modified antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 2337-2344.
380. Virovic L, Wu CH, Konishi M, and Wu GY (2005) Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. *Expert Opin Drug Deliv*, **2**, 707-717.
381. Vishnuvardhan D, Kakiuchi N, Urvil PT, Shimotohno K, Kumar PK, and Nishikawa S (1997) Expression of highly active recombinant NS3 protease domain of hepatitis C virus in *E. coli*. *FEBS Lett*, **402**, 209-212.
382. Vlassova AV, Ilves H, and Johnston BH (2006) Inhibition of hepatitis C IRES-mediated gene expression by 8-17 deoxyribozymes in human tissue culture cells. *Dokl Biochem Biophys*, **410**, 257-259.
383. Vo NV, Oh JW, and Lai MM (2003) Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology*, **307**, 301-316.
384. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, and Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, **11**, 791-796.
385. Wakita T and Wands JR (1994) Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence. *J Biol Chem*, **269**, 14205-14210.
386. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, and Branch AD (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*, **7**, 710-721.

387. Wang S, Wang X, Guan W, and Li M (2000) Specific regulatory inhibition of transfected HepG(2) with HCV 5'NCR by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **8**, 288-290.
388. Wang X, Wang S, Guan W, and Mao B (2001a) [Inhibitory effects of phosphorothioate antisense oligonucleotides on gene expression controlled by HCV 5'NCR in nude mice xenograft]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **9**, 285-287.
389. Wang XH, Wang SQ, Wen SY, Guan W, and Mao BZ (2001b) [The inhibitory effects of hepatocyte targeting pH-sensitive liposome mediated phosphorothioate antisense oligonucleotide on gene expression controlled by HCV 5'NCR]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, **17**, 626-630.
390. Wang Y, Kato N, Jazag A, Dharel N, Otsuka M, Taniguchi H, Kawabe T, and Omata M (2006) Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*, **130**, 883-892.
391. Wasley A and Alter MJ (2000) Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*, **20**, 1-16.
392. Watashi K and Shimotohno K (2007) Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol*, **17**, 245-252.
393. Welch PJ, Tritz R, Yei S, Leavitt M, Yu M, and Barber J (1996) A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: in vitro and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Ther*, **3**, 994-1001.
394. Welch PJ, Yei S, and Barber JR (1998) Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol*, **10**, 163-171.
395. Wen XY, Bao WG, Yang XY, Tian MM, Wang F, and Niu JQ (2005) [Cleavage of HCV by HCV specific deoxyribozyme in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **13**, 900-902.
396. Williamson JR (1993) G-quartets in biology: reprise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3124.

397. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, and Richardson CD (2003) RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2783-2788.
398. Wilson JA and Richardson C. The role of Argonaute 2, the RISC "slicer", in hepatitis C virus and BVDV replication. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 37. 20050b. Montréal, Canada. *Conference Proceeding*.
399. Wilson JA and Richardson C. The role of Argonaute 2, the RISC "slicer", in hepatitis C virus and BVDV replication. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 37. 20050a. Montréal, Canada. *Conference Proceeding*.
400. Wilson JA and Richardson C (2005) The role of Argonaute 2, the RISC "slicer", in hepatitis C virus and BVDV replication. *Conference Proceeding*, 37.
401. Wilson JA and Richardson CD (2005) Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol*, **79**, 7050-7058.
402. Witkowski JT, Robins RK, Sidwell RW, and Simon LN (1972) Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J Med Chem*, **15**, 1150-1154.
403. Wo JE, Wu XL, Zhou LF, Yao HP, Chen LW, and Dennin RH (2005) Effective inhibition of expression of hepatitis B virus genes by DNAzymes. *World J Gastroenterol*, **11**, 3504-3507.
404. Wo JE, Wu XL, Zhu HH, Zhou LF, Yao HP, and Chen LW (2003) [DNAzymes in vitro inhibit the expression of hepatitis B virus genes]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **32**, 112-115.
405. Wong T and Lee SS (2006) Hepatitis C: a review for primary care physicians. *CMAJ*, **174**, 649-659.

406. Wu CH and Wu GY (1998) Targeted inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression in human hepatoma cell lines. *Gastroenterology*, **114**, 1304-1312.
407. Xie YY, Zhao XD, Jiang LP, Liu HL, Wang LJ, Fang P, Shen KL, Xie ZD, Wu YP, and Yang XQ (2006) Inhibition of respiratory syncytial virus in cultured cells by nucleocapsid gene targeted deoxyribozyme (DNAzyme). *Antiviral Res*, **71**, 31-41.
408. Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, and Prieto J (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology*, **244**, 513-520.
409. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, and Ou J (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J*, **20**, 3840-3848.
410. Xue Q, Ding H, Liu M, Zhao P, Gao J, Ren H, Liu Y, and Qi ZT (2007) Inhibition of hepatitis C virus replication and expression by small interfering RNA targeting host cellular genes. *Arch Virol*, **152**, 955-962.
411. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko LV, and Vlassov VV (1989) Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6454-6458.
412. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, and Bukh J (1997) Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8738-8743.
413. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, and Kohara M (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol*, **72**, 6048-6055.
414. Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Tasinato A, Urushitani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, and Mizusawa H (2004) siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, **314**, 283-291.
415. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, and Mizusawa H (2003) Inhibition of



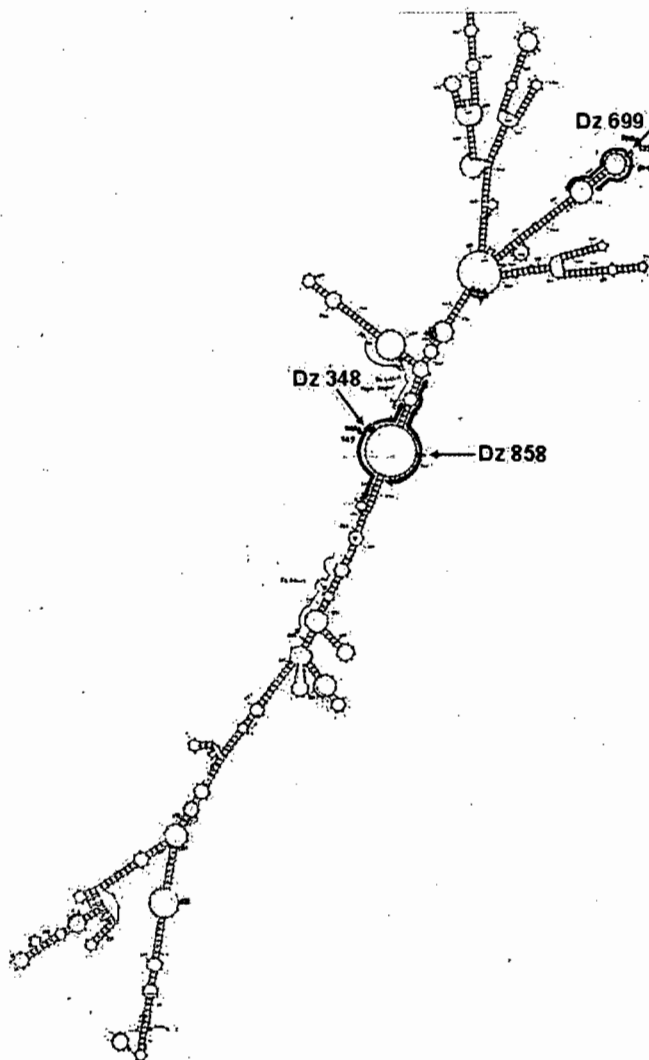
intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep*, **4**, 602-608.

416. You S, Stump DD, Branch AD, and Rice CM (2004) A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, **78**, 1352-1366.
417. Yu YC, Gu CH, Wang SQ, Mao Q, Chen ZB, and Liu HL (2003) [Activity of specific deoxyribozymes to cleave hepatitis C virus RNA in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **11**, 156-158.
418. Zaborowska Z, Furste JP, Erdmann VA, and Kurreck J (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme. *J Biol Chem*, **277**, 40617-40622.
419. Zamaratski E, Pradeepkumar PI, and Chattopadhyaya J (2001) A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods*, **48**, 189-208.
420. Zamecnik PC and Stephenson ML (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 280-284.
421. Zanetti AR, Tanzi E, Paccagnini S, Principi N, Pizzocolo G, Caccamo ML, D'Amico E, Cambie G, and Vecchi L (1995) Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. *Lancet*, **345**, 289-291.
422. Zein NN (2000) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 223-235.
423. Zeuzem S, Sarrazin C, Tarral A, Forestier N, Gupta S, Deckman D, Fellows D, and Zhang J (2005) Antiviral activity of SCH 503034, a HCV protease inhibitor, administered as monotherapy in hepatitis C genotype 1 (HCV-1) patients refractory to pegylated interferon (PEG-IFN-alpha). *Hepatology*, **42**, 233A.

424. Zhang G, Budker V, and Wolff JA (1999a) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, **10**, 1735-1737.
425. Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, Azad R, Conklin B, Fox MC, and Anderson KP (1999b) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 347-353.
426. Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Araki H, Murata T, and Shimotohno K (2005) Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region. *Virology*, **342**, 276-285.
427. Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Iwai T, Matsushita Y, Shimamura H, Araki H, and Shimotohno K (2004) Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, **320**, 135-143.
428. Zhang X, Xu Y, Ling H, and Hattori T (1999c) Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett*, **458**, 151-156.
429. Zhao CA, Zhao XD, Yu HG, Wu YP, and Yang XQ (2003) [Inhibition of respiratory syncytial virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNAzyme]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, **41**, 594-597.
430. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, and Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9294-9299.
431. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.
432. Zuker M (2000) Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 303-310.
433. Zuker M and Stiegler P (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res*, **9**, 133-148.

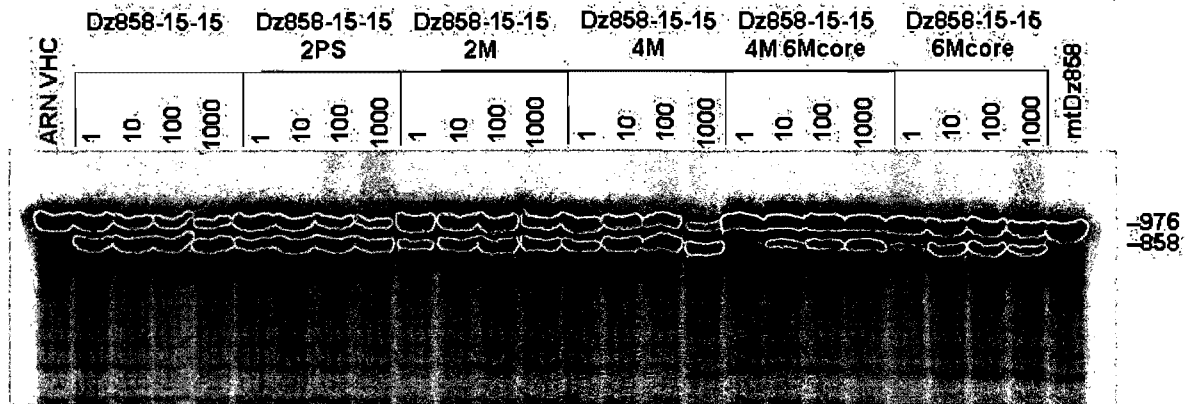
## Annexes

### 1. Repliement bidimensionnel de l'ARN représentant la région 5'-RNC et la capsid du VHC.



**Figure 7.** Repliement bidimensionnel de l'ARN de la région 5'-RNC et de la capsid du VHC. Le programme Mfold a été utilisé par Oanh N.L. Le pour analyser la région 5'-RNC et la capsid du VHC afin d'identifier des régions simple brin comme cibles potentielles pour des déoxyribozymes. Le motif '10-23' a été utilisé pour dessiner trois deoxyribozymes ciblant des boucles simple brin aux positions 348, 699 et 858 du génome.

## 2. Coupure biochimique de l'ARN de la région 5'RNC-capside par des désoxyribozymes contenant différentes modifications.



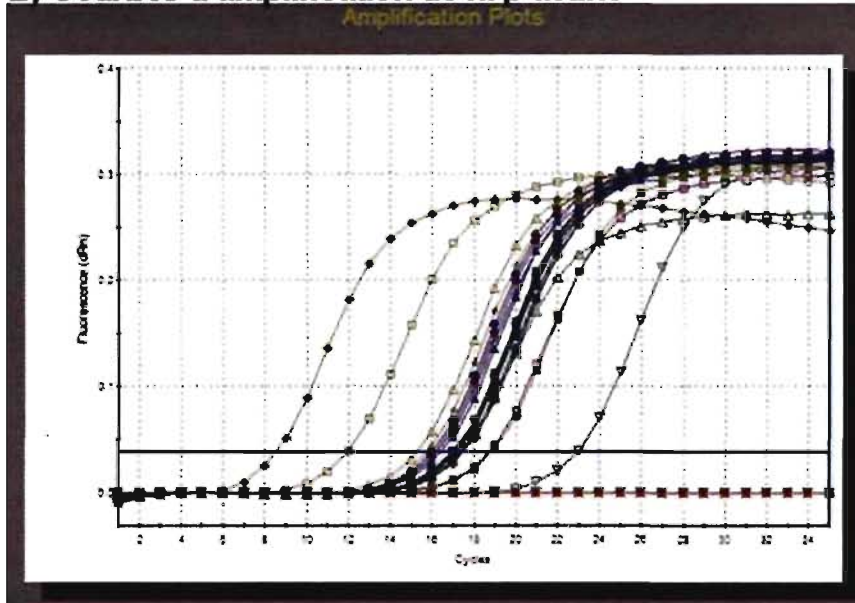
**Figure 8.** Coupure biochimique de l'ARN de la région 5'RNC-capside du VHC marquée au  $P^{32}$  par différents désoxyribozymes. Le substrat d'ARN de 976 nt représentant la région 5'RNC-capside a été généré à partir d'un cDNA amplifié du plasmide pGEM-7Zf-HCV par PCR à l'aide des amorces 5'-TGTAATACGACTCACTATAGCGA-3', encodant le promoteur de la polymérase du bacteriophage T7, et 5'-TCATACACAATGCTTGCGTTG-3'. L'ADN amplifié a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et purifié à l'aide du QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON). L'ARN marqué radioactivement a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g de cDNA à l'aide de la trousse MegaScript T7 transcription kit (Ambion, Austin, TX). La réaction de coupure a été effectuée en utilisant 100 nM d'ARN radioactif et des doses croissantes de Dz allant de 0.01 à 100  $\mu$ M pendant 1 h à 37°C dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 et 10 mM de  $MgCl_2$ . Cette figure est un gel représentatif des réactions de coupure effectuées.

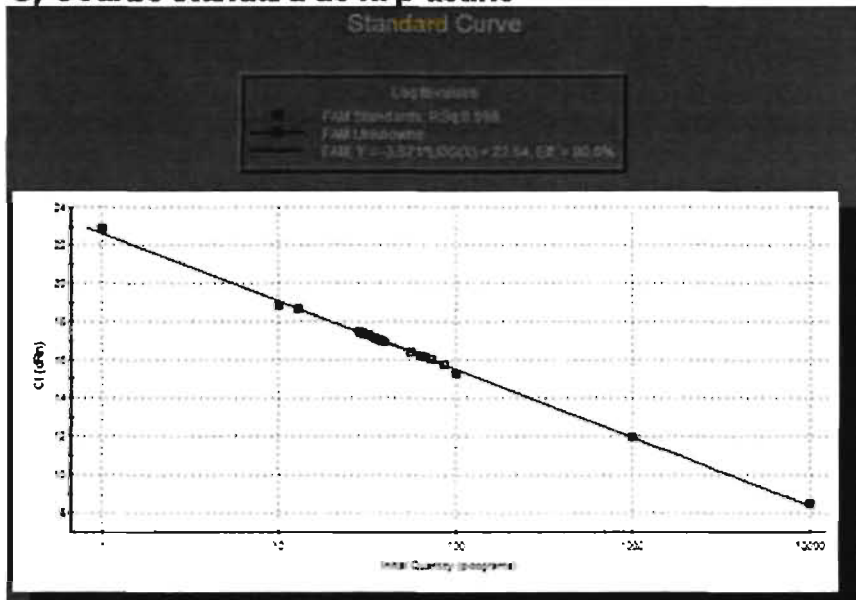
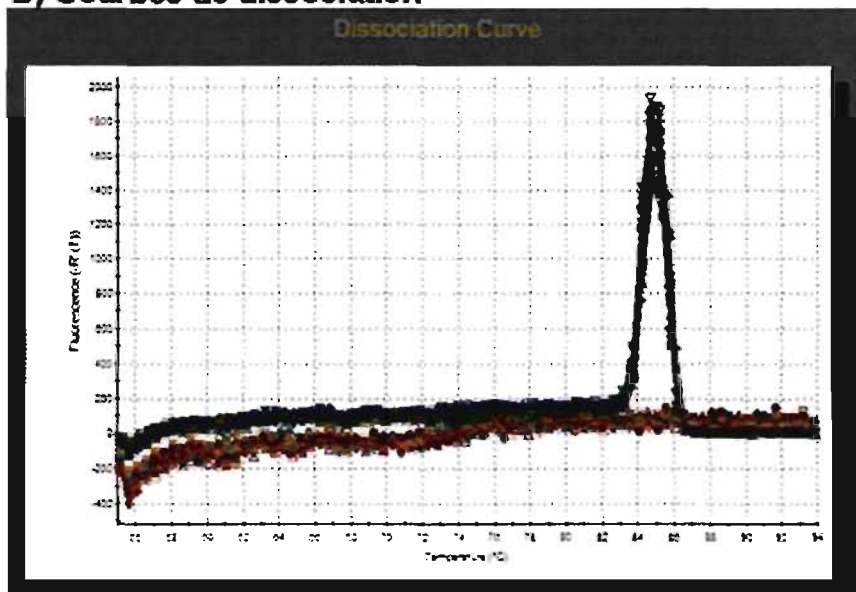
### 3. Exemples de PCR en temps réel.

#### A) Contenu des puits

AM	1	2	3	4	5
A			Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
B		REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
C		Standard REF 1.00e+000 FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
D		Standard REF 1.00e+001 FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
E		Standard REF 1.00e+002 FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
F		Standard REF 1.00e+003 FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
G		Standard REF 1.00e+004 FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
H		No RT REF FAM	No RT REF FAM	No RT REF FAM	No RT REF FAM

#### B) Courbes d'amplification de la $\beta$ -actine



**C) Courbe standard de la  $\beta$ -actine****D) Courbes de dissociation**

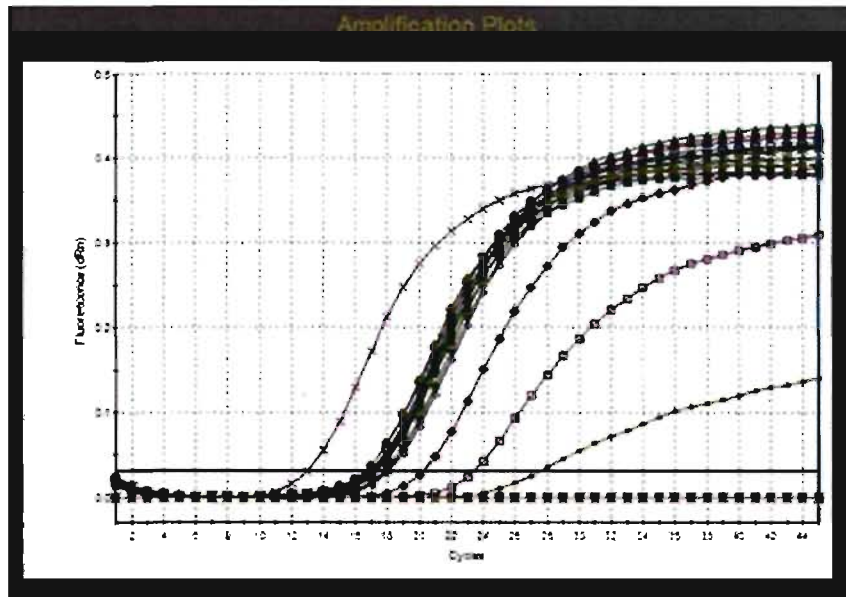
**E) Quantité de  $\beta$ -actine**

Ali	1	2	3	4	5
A			Ref	Ref	Ref
			5.22e+01	1.25e+01	5.26e+01
B			Ref	Ref	Ref
			7.17e+01	3.65e+01	3.28e+01
C	Standard	Ref	Ref	Ref	Ref
	1.00e+00	7.17e+01	3.65e+01	3.28e+01	
D	Standard	Ref	Ref	Ref	Ref
	1.00e+01	2.81e+01	3.65e+01	2.82e+01	
E	Standard	Ref	Ref	Ref	Ref
	1.00e+02	5.66e+01	5.62e+01	3.79e+01	
F	Standard	Ref	Ref	Ref	Ref
	1.00e+03	2.82e+01	3.02e+01	3.89e+01	
G	Standard	Ref	Ref	Ref	Ref
	1.00e+04	3.89e+01	3.62e+01	3.19e+01	

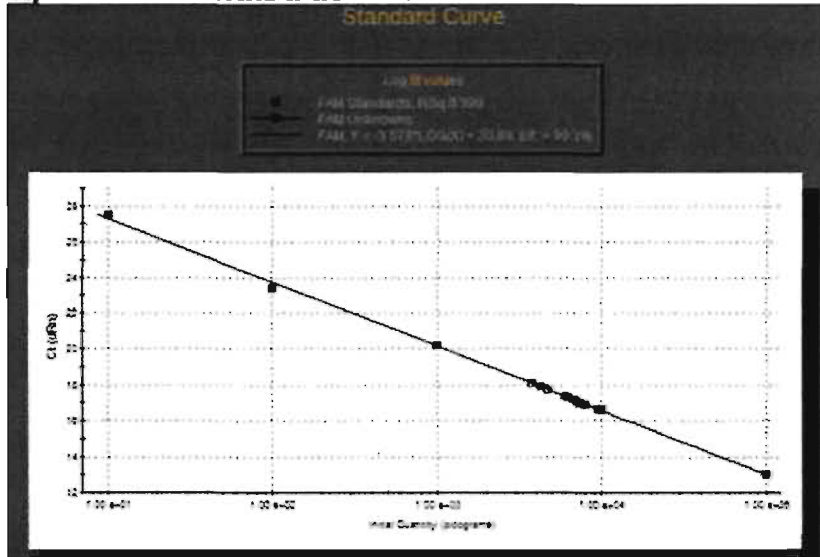
**F) Description des puits et quantité**

Well	Well Name	Ct (dRn)	Quantity (pg)	RSq (dRn)
B2	H2O	0	0	0.999
C2	standard	22.92	1.00E+00	0.998
D2	standard	18.83	1.00E+01	0.998
E2	standard	15.27	1.00E+02	0.998
F2	standard	11.96	1.00E+03	0.998
G2	standard	8.5	1.00E+04	0.998
A3	Mock	15.74	8.53E+01	0.998
B3, C3	HCV mean	16.01	7.18E+01	0.998
D3	Dz858-2-PS	17.46	2.81E+01	0.998
E3	Dz858-4-OMe	16.13	6.64E+01	0.998
F3	Dz2-2-PS	17.41	2.92E+01	0.998
G3	ssDz858mt	17.12	3.50E+01	0.998
A4	Mock	18.68	1.28E+01	0.998
B4, C4	HCV mean	17.06	3.65E+01	0.998
D4	Dz858-2-PS	17.04	3.69E+01	0.998
E4	Dz858-4-OMe	16.41	5.54E+01	0.998
F4	Dz2-2-PS	17.35	3.03E+01	0.998
G4	ssDz858mt	17.05	3.66E+01	0.998
A5	Mock	16.23	6.25E+01	0.998
B5, C5	HCV mean	17.17	3.40E+01	0.998
D5	Dz858-2-PS	17.46	2.82E+01	0.998
E5	Dz858-4-OMe	17.01	3.76E+01	0.998
F5	Dz2-2-PS	16.95	3.91E+01	0.998
G5	ssDz858mt	17.27	3.19E+01	0.998

**G) Courbes d'amplification HCV**



H) Courbe standard de HCV



I) Quantité de HCV

All	1	2	3	4	5
A					
B			Ref	Ref	Ref
C		Standard	Ref	Ref	Ref
D		Standard	Ref	Ref	Ref
E		Standard	Ref	Ref	Ref
F		Standard	Ref	Ref	Ref
G		Standard	Ref	Ref	Ref

J) Description des puits et quantité

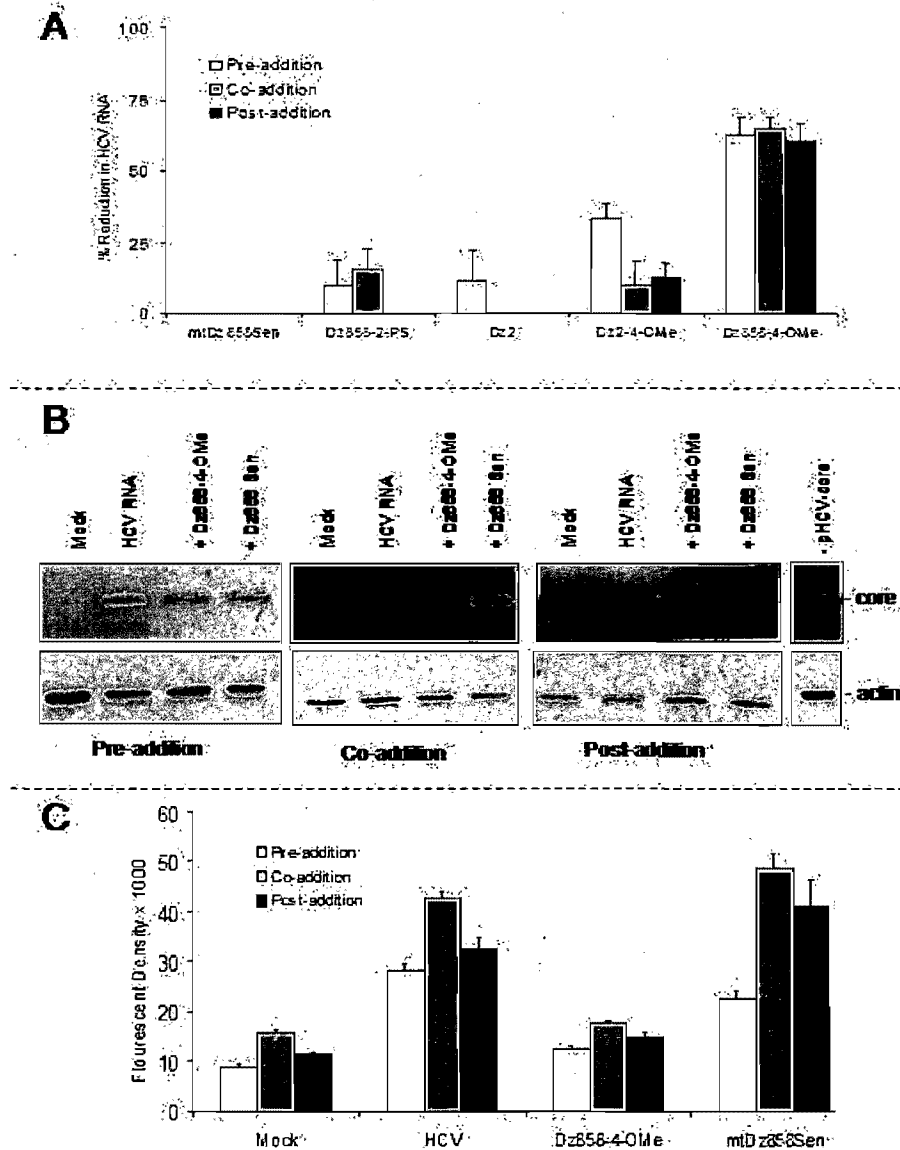
Well	Well Name	Ct (dRn)	Quantity (pg)	RSq (dRn)
B2	H2O	0	0	0.999
C2	standard	27,52	1.00E+01	0.999
D2	standard	23,39	1.00E+02	0.999
E2	standard	20,2	1.00E+03	0.999
F2	standard	16,65	1.00E+04	0.999
G2	standard	13	1.00E+05	0.999
B3,C3	HCV mean	16,59	9.90E+03	0.999
D3	Dz858-2-PS	17,19	6.75E+03	0.999
E3	Dz858-4-OMe	18,1	3.75E+03	0.999
F3	Dz2-2-PS	17,2	6.67E+03	0.999
G3	ssDz858mt	16,97	7.77E+03	0.999
B4,C4	HCV mean	17,18	6.77E+03	0.999
D4	Dz858-2-PS	16,92	7.99E+03	0.999
E4	Dz858-4-OMe	17,91	4.23E+03	0.999
F4	Dz2-2-PS	17,12	7.05E+03	0.999
G4	ssDz858mt	17,37	5.98E+03	0.999
B5,C5	HCV mean	17,05	7.36E+03	0.999
D5	Dz858-2-PS	17,32	6.21E+03	0.999
E5	Dz858-4-OMe	17,76	4.67E+03	0.999
F5	Dz2-2-PS	16,92	8.01E+03	0.999
G5	ssDz858mt	16,65	9.53E+03	0.999

Figure 9. Exemples de PCR en temps réel effectués pour déterminer l'efficacité des désoxyribozymes en culture cellulaire. Les cellules HuH-7 ont été transfectées avec 23 nM de Dz et 3 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON) pendant 6h, lavées au PBS, et transfectées avec 1 µg d'ARN du VHC et 3 µL de Lipofectamine 2000. L'ARN total a été extrait 24 h suivant la deuxième transfection avec le TRI Reagent (Molecular



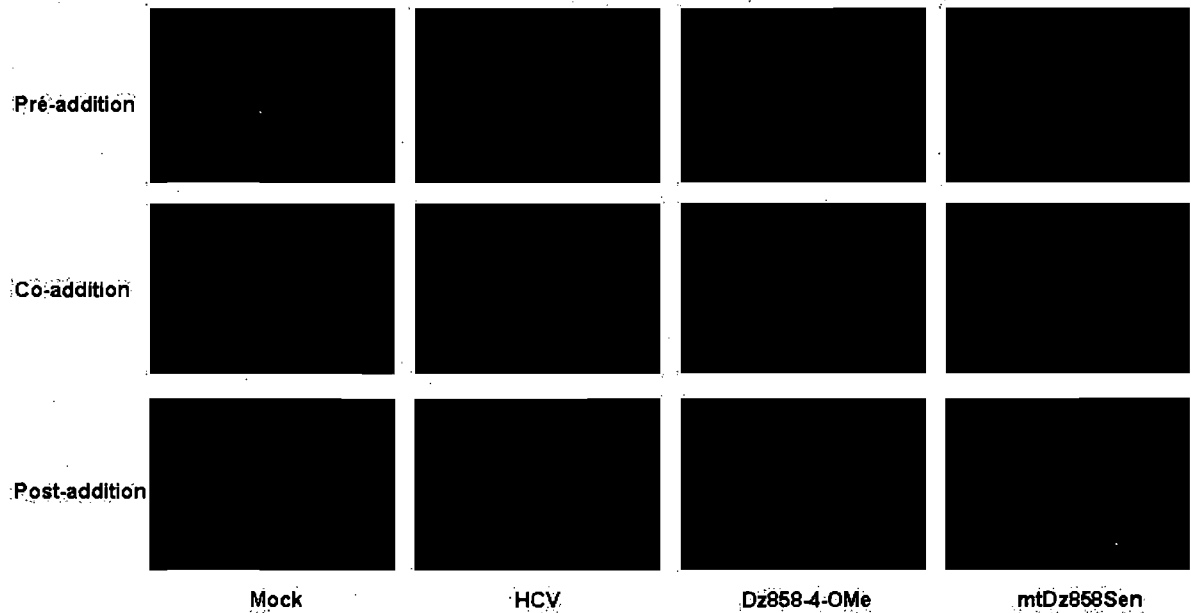
Research Center, Cincinnati, OH). La quantité d'ARN a été normalisée à l'aide du gène de la  $\beta$ -actine en utilisant les amorces 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3' et 5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3' en combinaison avec la trousse QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Mississauga, ON) (B-F). La quantité d'ARN du VHC a été évaluée à l'aide des amorces 5'-GGCGTGAACATGCAACAGGGAAT-3', de la sonde 5'-[5' 6-FAM™]TTCCGCTTACGAAGTGCACAACGTGT[3' IBFQ™]-3' et de l'amorce 5'-TGGAGCAGTCGTTTCGTGACATGAT-3' en combinaison avec la trousse QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen) (G-J). L'ADNc a été amplifié et quantifié avec le Mx3000P real-time PCR thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA). Les courbes standard utilisées pour déterminer la quantité d'ADNc étaient constituées de concentrations logarithmiques de cDNA de  $\beta$ -actine variant de 1 fg à 10 pg ou du plasmide pHCV-UTR-core variant de 10 fg à 100 pg.

#### 4. Efficacité des désoxyribozymes en culture cellulaire.



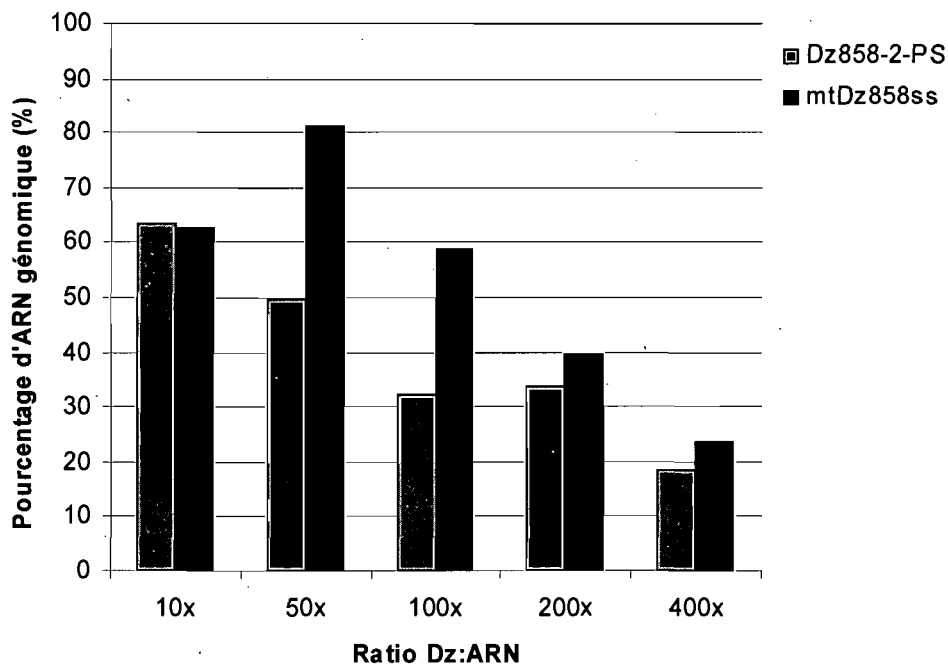
**Figure 10.** Réduction de l'ARN intracellulaire du VHC (A), de la protéine de la capsid (B) et de la réactivité antigénique (C) dans les cellules HuH-7 après différents régimes d'administration de Dz. L'ARN viral  $\pm$  SEM d'au moins trois expériences a été quantifié par PCR en temps réel (A). Les cellules ont été récoltées 24 h (pré- et co-addition) ou 36 h (post-addition) suivant le traitement au Dz et traitées pour immunobuvarge avec des anticorps contre le VHC ou l'actine (B) ou pour immunofluorescence (C) (Détailé dans l'article no.2).

## 5. Immunofluorescence des cellules HuH-7 après traitement.



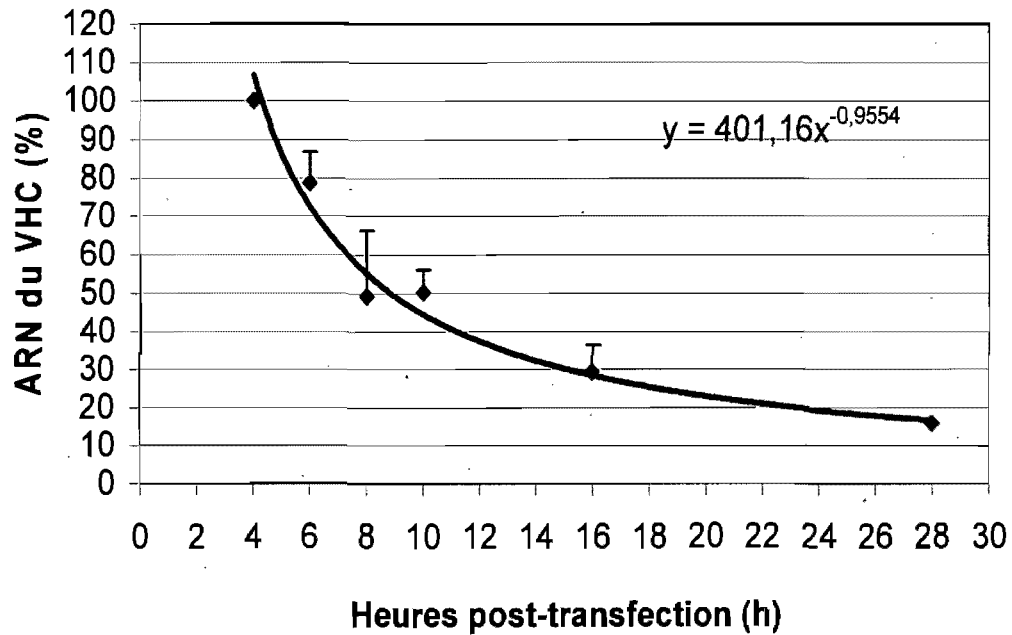
**Figure 11.** Réactivité antigénique des cellules HuH-7 après traitement au Dz858-4-OMe. Les cellules HuH-7 ont étéensemencées dans des chambres de lames de verre (Nalgene Nunc, Naperville, IL). Les transfections ont été effectuées selon les trois régimes d'administration de Dz. Les cellules ont été fixées au méthanol et incubées avec un mélange pré-absorbé de sérum humain positif pour le génotype 1b du VHC (1:50) (généreusement fournit par le Dr Hugo Soudeyns). Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG d'humain (1:600, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) et 3 µg/mL de streptavidine conjuguée au DTAF (dichlorotriazinyl amino fluorescein) (Jackson ImmunoResearch). L'immunofluorescence a été quantifiée digitalement dans 8 à 10 champs microscopiques choisis aléatoirement et mesurée à l'aide du programme ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD). Le pourcentage de fluorescence obtenu est indiqué à la figure 10C.

## 6. Détermination de la concentration optimale de désoxyribozymes à utiliser pour les transfections.



**Figure 12.** Détermination de la dose optimale de Dz858 à utiliser pour les cotransfections. Différentes concentrations de Dz858-2-PS ont été cotransfectées avec 1  $\mu$ g d'ARN du VHC. L'ARN des cellules HuH-7 a été extrait et l'ARN viral a été quantifié par PCR en temps réel. Cette expérience a été effectuée une seule fois pour donner une approximation du ratio optimal entre le Dz et l'ARN viral à utiliser pour obtenir le maximum de coupure sans affecter considérablement l'efficacité de transfection de l'ARN viral. La dose optimale correspondait approximativement à 75x, soit 23.4 nMolaire de Dz.

## 7. Demie-vie de l'ARN génomique du VHC.



**Figure 13.** Taux de dégradation de l'ARN viral après transfection dans les cellules HuH-7. 1 µg d'ARN génomique du VHC a été transfecté dans les cellules HuH-7 avec 3 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). La première extraction a été effectuée 4 h suivant la transfection, ce temps correspond au moment où la quantité d'ARN transfectée dans la cellule est à son maximum. Cette expérience a été effectuée deux fois. La demie-vie de l'ARN est d'environ 9 h.

## 8. Évaluation de la toxicité cellulaire de Dz858-4-OMe.

### 8.1. Évaluation de la prolifération cellulaire

Transfection	Densité optique
HuH-7	0,741 ± 0,026
Lipofectamine 2000	0,725 ± 0,057
Dz858-4-OMe 6,25nM	0,722 ± 0,028
Dz858-4-OMe 25nM	0,833 ± 0,107
Dz858-4-OMe 100nM	0,819 ± 0,089

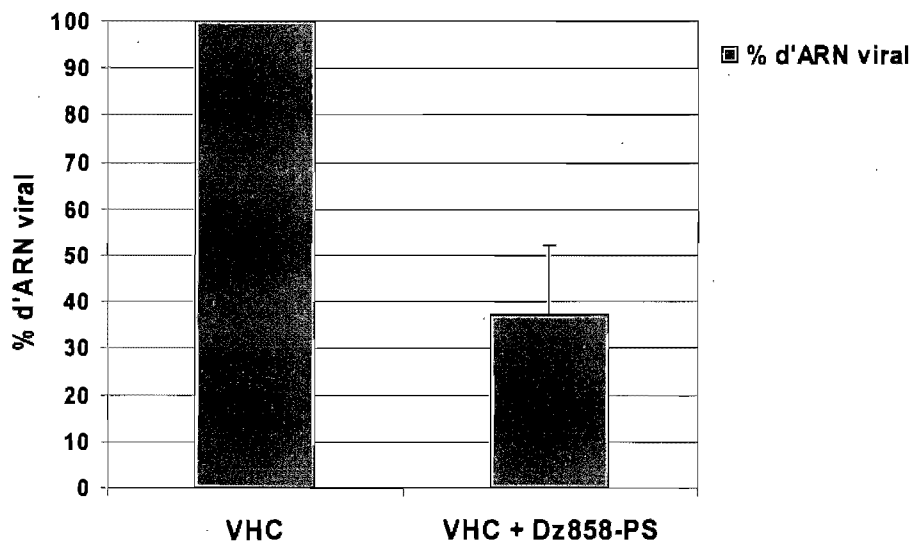
**Tableau I.** Évaluation de la viabilité et de la prolifération cellulaire par MTT. Les cellules HuH-7 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits et transfectées avec des doses croissantes de Dz858-4-OMe. Le test de MTT a été performé à l'aide de la trousse CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madisson, WI). Trois transfections ont été effectuées et la densité optique a été mesurée  $\pm$  SEM.

### 8.2. Évaluation de l'intégrité membranaire

Transfection	Densité optique
HuH-7	0,273 ± 0,057
Lipofectamine 2000	0,571 ± 0,057
Dz858-4-OMe 6,25nM	0,574 ± 0,079
Dz858-4-OMe 25nM	0,497 ± 0,034
Dz858-4-OMe 100nM	0,524 ± 0,049

**Tableau II.** Évaluation de la viabilité par l'intégrité membranaire à l'aide de la LDH. Les cellules HuH-7 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits et transfectées avec des doses croissantes de Dz858-4-OMe. Le test de MTT a été performé à l'aide de la trousse CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madisson, WI). Trois transfections ont été effectuées et la densité optique a été mesurée  $\pm$  SEM.

## 9. Expérience préliminaire d'efficacité de coupure dans les souris.



**Figure 14.** Pourcentage de coupure de l'ARN viral dans les souris NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ . Les cellules 293 ont étéensemencées à  $4.5 \times 10^5$  cellules par puit dans des plaques de six puits pendant 24 h. Ces cellules ont ensuite été transfectées avec 2,5  $\mu\text{g}$  d'ARN génomique du VHC et 7.5  $\mu\text{g}$  de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). Après 5 h, les cellules ont été trypsinisées, lavées avec saline, et resuspendues à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules par 100  $\mu\text{l}$  de matrigel (BD Biosciences, Mississauga, ON). 100  $\mu\text{L}$  d'Opti-MEM (Invitrogen) contenant 7.5  $\mu\text{g}$  de Lipofectamine 2000 ou 9  $\mu\text{g}$  de Dz858-PS et 7.5  $\mu\text{g}$  de Lipofectamine 2000 ont été combinés au mélange de cellules et de matrigel juste avant l'injection sous-cutanée. Neuf souris (Black-6 NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ , provenant du Dr Elie Haddad) ont été injectées dans le flanc gauche avec le contrôle négatif contenant les cellules, le matrigel et l'ARN viral. Chaque souris a également été injectée dans le flanc droit avec le mélange contenant le Dz858-PS. Après 18 h dans l'animal, le matrigel a été récupéré et l'ARN total a été isolé au Trizol (Invitrogen). Le pourcentage de coupure de l'ARN du VHC a été déterminé par RT-PCR en temps réel tel que décrit à la figure 9. Le taux d'ARN a cependant été normalisé avec le gène GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) en utilisant les amorces 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' et 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'. La courbe standard pour évaluer la quantité d'ARN de GAPDH dans les cellules a été faite par dilutions sériées du nombre de cellules 293.

## 10. Alignement des séquences du VHC reconnues par Dz858-15-15.

Séquence du Dz858                    3' -CCAACGAGAA**N**AGA AGAAGGAGAACCGAG-5'    **N=A/G**  
 Séquence cible du VHC            5' -GGUUGCUCUUUUUUAUCUUCUUCUUGGCUC-3'

1a.AR.42\_MONTHS.AF359349\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.AU.AUS1.M74805\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.DE.GM2.M74812\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.DK.DK7.U10194\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCCC  
 1a.DO.DR4.U10196\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCTT  
 1a.ES.SP2.M74804\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.FR.HPCSTRUCTA.L12353\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCCC  
 1a.GB.Glasgow.AY885238\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.GB.HCVRNACEE.X84079\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCCC  
 1a.IR.TEHRAN-12.AF512996\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.IT.I21.M74811\_ GGTGCTCTTTTCTATTTTCTTCTGGCCC  
 1a.IT.S14.U10206\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTAGCCC  
 1a.IT.S18.U10207\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.JP.HC-J1.D00831\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.JP.PT1AC-5.AB092962\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.SE.SW1.U10222\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.TH.BB10.U55281\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.TH.BB43.U55283\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTAGCCC  
 1a.TH.BB81.U55285\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTAGCCC  
 1a.US.12c3-12.AY522134\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.12v13c08.DQ061303\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.13v13c21.DQ061307\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.17v14c18.DQ061312\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCCT  
 1a.US.18c130-32.AY522010\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTT  
 1a.US.18v23c09.DQ061318\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCCT  
 1a.US.19c138-12.AY522053\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.21v09c11.DQ061322\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
 1a.US.22i146-12.AY522100\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.28v04c12.DQ061326\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
 1a.US.29v03c04.DQ061327\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
 1a.US.3i50-12.AY522223\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.3i50-13.DQ077736\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.5i10-16.AY521912\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.8I71-19.AY522272\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.9c76-35.AY522315\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.HCV-1.M62321\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.HCV-1/90.AF268580\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.HCV-TWB-1.AY615798\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.PD101.AY695437\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.US11.U10232\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.US.US5.M74808\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.\_.AY365214.AY365214\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
 1a.\_.COLONEL.AF290978\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.\_.DJ6-4.AF529293\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.\_.H77-H21.AF011753\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a.\_.HEC278830.AJ278830\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCCC



1a. \_LTD1-2-XF222.AF511948\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a. \_LTD3-2-XF223.AF511949\_ GGTGCTCTTTCTCTATGTTCCCTTCTGGCCC  
 1a. \_LTD6-2-XF224.AF511950\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
     1a. \_NB74.AY231582\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
 1a. \_PHCV-1/SF9\_A.AF271632\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
     1a. \_S6a.AJ557443\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
     1a. \_S6b.AJ557444\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCC

Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUCUAUCUUCUCUUGGCUC  
     1b.AR.ARG2.M74815\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.AU.HCV-A.AJ000009\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGGTT  
     1b.BE.BE105.L38318\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.CN.HC-C2.D10934\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.CN.HCV-S.AY460204\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.CN.HEBEI.L02836\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTAGCCT  
     1b.CN.Hunan-AB.U63376\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.CN.Hunan-C.U63377\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTAGCCT  
     1b.CN.Hunan-D.U63378\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTAGCCT  
     1b.CN.Hunan-E.U63379\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTAGCCT  
     1b.CN.PRC1.M74888\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTC  
     1b.DE.Con1.AJ238799\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTTTGGCCT  
     1b.DE.D1.U10189\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.DE.HCV-AD78P1.AJ132997\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.DE.HD-1.U45476\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.DE.NC1.AJ238800\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTTTGGCCT  
     1b.DK.DK1.U10193\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.ES.SP1.M74806\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.FR.HPCSTRUCTB.L12354\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.HK.HK3.U10199\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.HK.HK4.U10200\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.HK.HK5.U10201\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCCT  
     1b.IE.AD22c06.DQ061374\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.IE.ADin2c08.DQ061378\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.IN.IND3.U10202\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTAGCCT  
     1b.IN.IND8.U10203\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCCT  
     1b.IT.I15.M74809\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.IT.S45.U10209\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.IT.S9.U10212\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.JP.16-8.AB008447\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.JP.21.AB077701\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTCTAGCTC  
     1b.JP.22.AB077702\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.JP.24.AB077703\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCC  
     1b.JP.25.AB077704\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.JP.26.AB077705\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTAGCCT  
     1b.JP.32.AB077706\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCTC  
     1b.JP.33.AB077707\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCCTAGCTC  
     1b.JP.34.AB077708\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.JP.38.AB077709\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.JP.42.AB077710\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT  
     1b.JP.43.AB077711\_ GGTGCCCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCT

1b.JP.45.AB077712\_GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.46.AB077713\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.47.AB077714\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.48.AB077715\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.49.AB077716\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.50.AB077717\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.51.AB077718\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.53.AB077719\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.54.AB077720\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.55.AB077721\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.H14-10.AB077737\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.H15-1.AB077738\_GGTTGCCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.H17-2.AB077739\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.H17-3.AB077740\_GGTTGCTCCTTTCTTTGTCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.H19-4.AB077741\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.H21-2.AB077742\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
1b.JP.H5-1.AB077743\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
1b.JP.H5-2.AB077745\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.H5-4.AB077746\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.H5-5.AB077747\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HC-J2.D10074\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HC-J4.D00832\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.HCV-476.D10688\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTCGGCTT  
1b.JP.HCV-BK.M58335\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HCV-J.D90208\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
1b.JP.HCV-JH.D00574\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HCV-K1-R1.D50480\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HCV-K1-R2.D50481\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.HCV-K1-S3.D50484\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCCT  
1b.JP.HCV-KF.D10687\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTCGGCTT  
1b.JP.HCV-N.AF139594\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HCV-N.D63857\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.HCV-O.AB191333\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.J33.D14484\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.JH1.M74807\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.JK1.X61591\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.JK2.X61593\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.JK3.X61592\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.JK4.X61594\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.JK5.X61595\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.JT.D11355\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCC  
1b.JP.L02.AB077729\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
1b.JP.L04.AB077731\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCATAGCTT  
1b.JP.L05.AB077732\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.L06.AB077733\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.L07.AB077734\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
1b.JP.L08.AB077735\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTT  
1b.JP.L09.AB077736\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCC  
1b.JP.L11.AB077722\_GGTTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
1b.JP.L13.AB077723\_GGTTGCCCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTT

1b. JP. L14. AB077724 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. L15. AB077725 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCCT  
 1b. JP. L17. AB077726 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
 1b. JP. L20. AB077727 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. L27. AB077728 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. L31. AB077730 \_ GTTGCTCTTTTCTATTTTCTCTTAGCTT  
 1b. JP. MD1-911. AF165046 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
 1b. JP. MD10-386. AF165064 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. MD2-484. AF165048 \_ GTTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. MD3-673. AF165050 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. MD4-491. AF165052 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. MD5-400. AF165054 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
 1b. JP. MD6-675. AF165056 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. MD7-886. AF165058 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. MD8-1114. AF165060 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. MD9-1012. AF165062 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTC  
 1b. JP. patient\_4-1. S78528 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. JP. PTCH7C10. AB063486 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTH1C58. AB062192 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTH2C82. AB062212 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTH3C85. AB062232 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTH4C169. AB062272 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTL1C20. AB061949 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTL2C54. AB061966 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. PTL3C53. AB061986 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTC  
 1b. JP. PTL4C47. AB062019 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. JP. TMORF. D89872 \_ GTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
 1b. KR. HCV-L2. U01214 \_ GTTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTTTAGCTT  
 1b. KR. HPCCOREENV. L20498 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. KR. N. AY308072 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTC  
 1b. PE. P10. U10204 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. PE. P8. U10205 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTT  
 1b. RU. 274933RU. AF176573 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. RU. 589. AY070174 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. SE. SW2. U10223 \_ GTTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. TH. BB16. U55282 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. TH. BB51. U55284 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. TR. HCV-TR1. AF483269 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. TW. HCU89019. U89019 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT  
 1b. TW. HPCGENANTI. M84754 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. TW. T10. U10225 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. TW. T3. U10227 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. US. 11v07c07. DQ061299 \_ GTTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. US. 17c124-12. AY521956 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. US. 2I42-11. AY522168 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. US. US4. M74813 \_ GTTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. US. US6. U10234 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. ZA. SA10. U10213 \_ GTTGCCCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. \_ .110. AB086043 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCC  
 1b. \_ .69. AB086044 \_ GTTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTT

1b. .74.AB086045\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. .76.AB086046\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. .84.AB086047\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. .87.AB086048\_ GGTGCTCCTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. .92.AB086049\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCC  
 1b. .96.AB086050\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. .97.AB086051\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. .AB016785.AB016785\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. .AB037249.AB037249\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
 1b. .AF072824.AF072824\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTAGCCC  
 1b. .AY365213.AY365213\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .CORÈD.AF531454\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
   1b. .COREND.AF531455\_ GGTGCTCCTTTTATATTTTCTCTTGGCTG  
     1b. .D89815.D89815\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTC  
       1b. .GH1.M74810\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
     1b. .H3-1.AB086052\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
     1b. .HCR6.AY045702\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
       1b. .HCV-B.S76540\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
     1b. .HCV-JS.D85516\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCV-S1.AF356827\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
 1b. .HCVCLb001.AY652608\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCCT  
   1b. .HVCEN.X65924\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCCT  
   1b. .HCVT050.AB049087\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCT  
   1b. .HCVT094.AB049088\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
   1b. .HCVT109.AB049089\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
   1b. .HCVT140.AB049090\_ GGTGCCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCVT142.AB049091\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
   1b. .HCVT145.AB049092\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTT  
   1b. .HCVT150.AB049093\_ GGTGCCCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCVT161.AB049094\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCTC  
   1b. .HCVT169.AB049095\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTAGCCTT  
   1b. .HCVT191.AB049096\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCC  
   1b. .HCVT197.AB049097\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCVT209.AB049098\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCVT212.AB049099\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCVT217.AB049100\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .HCVT221.AB049101\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
     1b. .HPCE2COR.M86779\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
     1b. .HPCCHCPO.D45172\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTT  
       1b. .HPCPP.D30613\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTTGGCTT  
   1b. .HPCTKCP.D83645\_ GGTGCTCTTTCTCTATTTTCTCTTAGCCTT  
 1b. .HPCUNKCDS.M96362\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .M1LE.AB080299\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .MD11.AF207752\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .MD12.AF207753\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .MD13.AF207754\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .MD14.AF207755\_ GGTGCTCTTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
   1b. .MD15.AF207756\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC  
   1b. .MD16.AF207757\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTT  
   1b. .MD17.AF207758\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTC

1b. .MD18.AF207759\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD19.AF207760\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD20.AF207761\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD21.AF207762\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD22.AF207763\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .MD23.AF207764\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTAGCTT  
 1b. .MD24.AF207765\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD25.AF207766\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .MD26.AF207767\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .MD27.AF207768\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD28.AF207769\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCC  
 1b. .MD29.AF207770\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .MD30.AF207771\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD31.AF207772\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .MD32.AF207773\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .MD33.AF207774\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .MD34.AF208024\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
     1b. .NAC5.M74814\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
 1b. .No--11.AB154186\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--13.AB154188\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--15.AB154190\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--17.AB154192\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--19.AB154194\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--21.AB154196\_ GGTGCTCTTTCTCTCTTCCTCATGGCTT  
 1b. .No--23.AB154198\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--25.AB154200\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--27.AB154202\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--29.AB154204\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
     1b. .No--3.AB154178\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .No--31.AB154206\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
     1b. .No--5.AB154180\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
     1b. .No--7.AB154182\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
     1b. .No--9.AB154184\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 1b. .pCV-J4L10.AF054259\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
     1b. .pN4.1.D13406\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTC  
     1b. .S1-1.U45463\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
     1b. .S12.AB086053\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTAGCTC  
     1b. .S72727.S72727\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCC  
     1b. .S72728.S72728\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCC  
     1b. .S98.AB086054\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
     1b. .Source.AF313916\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
  
 Séquence cible de Dz858      GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCUUGGCUC  
     1c.ID.HC-G9.D14853\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTGGCTCGCTC  
     1c.ID.YS117.D16189\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTGGCTCGCTC  
 1c.IN.AY051292.AY051292\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTGGCTGCTC  
     1c.IN.Khaja1.AY651061\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCC  
     1c. .SR037.D16191\_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTGGCTCGCTC  
     1f.FR.FR2.L38350\_ GGTGCTCTTTNCTATCTTCCTCTGGCNT  
  
 Séquence cible de Dz858      GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCUUGGCUC

2a.FR.FR5.L38334 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.FR.FR6.L38335 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.FR.FR7.L38336 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.JP.AY746460.AY746460 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTAGCCC  
 2a.JP.HC-J5.D10075 \_ GATTGCTCCTTTTCTATTTTCTTGCTGGCGC  
 2a.JP.HC-J6.D00944 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.JP.JCH-6.AB047645 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCT  
 2a.JP.PT2AC-2.AB092963 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.TW.T2.U10226 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTAGCCC  
 2a.TW.T4.U10228 \_ GATTGCTCCTTTTCTATTTTCTTGCTGGCCC  
 2a.TW.T9.U10230 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.US.US10.U10231 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCT  
 2a.\_.G2AK1.AF169003 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.G2AK3.AF169004 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.JFH-2.AB077951 \_ GATTGCCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.MD2A-1.AF238481 \_ GATTGCTCCTTTTCTATTTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.MD2A-2.AF238482 \_ GATTGCTCCTTTTCTATTTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.MD2A-4.AF238483 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.MD2A-5.AF238484 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.MD2A-7.AF238485 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.NDM228.AF169002 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 2a.\_.NDM59.AF169005 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCT  
 2a.\_.pJ6CF.AF177036 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTGGCCC  
 Séquence à utiliser GGUUGCUCUUUUUAUCUUCUGCUGGCC

Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUAUCUUCUCUUGGCUC  
 2b.DK.DK11.U10190 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.DK.DK8.U10195 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTTGCTC  
 2b.JP.HC-J7.D10077 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.JP.HC-J8.D10988 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTTTCTTGCTTGCTC  
 2b.JP.MD2b1-2.AY232731 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.JP.MD2b10-2.AY232749 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTACTTGCCC  
 2b.JP.MD2b2-2.AY232733 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTTGCTC  
 2b.JP.MD2b3-2.AY232735 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.JP.MD2b4-2.AY232737 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACATGATC  
 2b.JP.MD2b5-2.AY232739 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTTGCTC  
 2b.JP.MD2b6-2.AY232741 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTTGCTC  
 2b.JP.MD2b7-2.AY232743 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTACTTGCCC  
 2b.JP.MD2b8-2.AY232745 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.JP.MD2b9-2.AY232747 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTTTCTTGCTTGCTC  
 2b.JP.PTCH2C12.AB092964 \_ GATTGCTCTTTCTATCTTCTTACTTGCCC  
 2b.SE.SW3.U10224 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.TW.T8.U10229 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTTGCTC  
 2b.US.US1.U10233 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.\_.JPPT971017.AB030907 \_ GATTGCTCTTTTCTATCTTCTTACTTGCTC  
 2b.\_.MD2B-1.AF238486 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTTACTTGCCC  
 Séquence à utiliser GGUUGCUCUUUUUAUCUUCUGCUUGCTC

Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUAUCUUCUCUUGGCUC  
 2c.BE.BE121.L38319 \_ GATTGCTCCTTTTCTATCTTCTCCTAGCCC  
 2c.BE.BE134.L38320 \_ GATTGCTCTTTCTATCTTCTTACTTGCTC

2c.BE.BE135.L38321\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTCTTAGCTC  
 2c.BE.BE136.L38322\_ GGTAGCTCNTTTTCTATCTTTCTCTTAGCCC  
 2c.FR.FR8.L38337\_ GGTGCTCCTTTTCTATTTTCTCTTAGCTC  
 2c.FR.FR866.D31972\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTTCTCCTAGCCC  
 2c.IT.S83.U10211\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTCTCTGGCCC  
 2c\_.BEBE1.D50409\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTTTTAGCCC  
 2c\_.CH321.L38324\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTCTAGCCC  
 2c\_.CH333.L38325\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTCCTAGCCC  
 2c\_.CH563.L38326\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTCTAGCCC  
 2c\_.CH593.L38327\_ GGTGCTCNTTTTCTATCTTTCTCTAGCCC  
 2c\_.CH610.L38328\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTAGCCC  
 2c\_.CH63.L38329\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTAGCCC  
 2c\_.CH889.L38330\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTTCTCTTAGCTC  
 2d.NL.NE92.L29631\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCTATTGGCCC  
 2e.ID.JK020.D49745\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTTGTTAGCTC  
 2e.ID.JK025.D49746\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTGCTAGCTC  
 2e.ID.JK109.D49755\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTTGTTAGCCC  
 2e.ID.JK128.D49756\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTTGTTAGCTC  
 2f.ID.JK081.D49754\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTACTGACCC  
 2f.ID.JK139.D49757\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTATTGGCCC  
 2i.VN.D54.DQ155561\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTTGTTAGCTC  
 2i/6p.VN.D3.DQ155560\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTTGTTAGCTC  
 2k.MD.VAT96.AB031663\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTACTAGCTC  
 Séquence à utiliser GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCCUAGCTC  
 Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCCUUGGCUC  
 3a.DE.HCVCE1.X76918\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a.DK.DK12.U10191\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a.FR.HPCSTRUC.L12355\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTCTCGCTC  
 3a.HK.HK10.U10197\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a.IN.NB125.AY231596\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a.IT.S2.U10208\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTTGCCC  
 3a.IT.S52.U10210\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a.JP.PT3AC-3.AB092965\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTAGCTC  
 3a\_.CB.AF046866\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a\_.HEM26.D14311\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a\_.K3A.D28917\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a\_.NZL1.D14305\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a\_.TH85.D14307\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3a\_.US114.D14309\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3b.IN.NB134.AY231588\_ GGTGCTCCTTCTCTATCTTCCTCCTCGCTC  
 3b.JP.HCV-Tr.D49374\_ GGTGCTCCTTCTCTATCTTCCTCCTCGCTC  
 3b.JP.ST.D11443\_ GGTGCTCCTTTTCTATTTTCTCCTCGCTC  
 3b.NP.NE137.D16616\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTTGCTC  
 3b.TH.TH527.D37839\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCCTCGCTC  
 3b.TH.TH576.D37840\_ GGTGCGCCTTTTCTATCTTCCTCCTCGCTC  
 3b\_.236.AY231590\_ GGTGCTCCTTCTCTATCTTCCTCCTCGCTC  
 3b\_.42.AY231587\_ GGTGCTCCTTCTCTATCTTCCTCCTCGCTC  
 3c.NP.NE048.D16612\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCTTGCTTGCTC  
 3d.NP.NE274.D16620\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCTTGCTTGCTC

3e.NP.NE145.D16618\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCTTGCTGCTC  
 3f.NP.NE125.D16614\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTTCTTGCTC  
 3h.CA.QC29.U33437\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCA  
 3h.SO.SOM1.AF216792\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCA  
 3h.SO.SOM2.AF216793\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCA  
 3h.SO.SOM3.AF216794\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCCA  
 3i.CA.QC100.AY434137\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTTCTCTGCTC  
 3i.CA.QC102.AY434140\_ GGTGCGCCTTTTCTATCTTTCTCTGCTC  
 3i.CA.QC125.AY434153\_ GGTGCGCCTTTTCTATCTTTCTCTGCTC  
 3k.ID.JK030.D49747\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 3k.ID.JK049.D49749\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCTT  
 3k.ID.JK055.D49750\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTCTCTGGCTT  
 3k.ID.JK070.D49752\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTCTCTGGCTT  
 3k.ID.JK072.D49753\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTGGCTT

7

Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCUUGGCUC  
 4a.AR.AR45.AF308576\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4a.CA.QC27.U33436\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTAGCAC  
 4a.CD.Z5.U10237\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTACTGGCAC  
 4a.EG.ED43.Y11604\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4a.JP.HEMA51.D45193\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4c.CD.Z6.U10238\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4c.CD.Z7.U10239\_ GGTGCTCTTTTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4c.GA.GB358.L38338\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTCTCTGGCAC  
 4d.AR.AR46.AF308577\_ GGTGCTCTTTNTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4d.DK.DK13.U10192\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4e.CM.CAM600.L29587\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTGGCGC  
 4e.GA.GB809.L29624\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4f.FR.FR12.L38332\_ GGTGCTCCTTTTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 4r.CD.Z4.U10236\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC

Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCUUGGCUC  
 5a.BE.BE95.L29577\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATTCTGCTC  
 5a.CA.QC21.U33434\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTGGCAC  
 5a.GB.EUH1480.Y13184\_ GGTGCCCCTTTCTCTATCTTTGTCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA1.U10216\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA11.U10214\_ GGTGCTCTTTCTCCATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA13.AF064490\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA3.U10217\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA4.U10218\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA5.U10219\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA6.U10220\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTGTCCTGGCAC  
 5a.ZA.SA7.U10221\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTATCCTGGCAC  
 5a.\_.FR741.D50466\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCATTCTGGCAC

Séquence à utiliser GGUUGCUCUUUUUCAUCUUAUCCUTGGCAC

Séquence cible de Dz858 GGUUGCUCUUUUUCAUCUCCUCUUGGCUC  
 6a.CA.QC26.U33435\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC  
 6a.HK.6a33.AY859526\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC  
 6a.HK.EUHK2.Y12083\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC  
 6a.HK.HK2.U10198\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC  
 6a.VN.VN11.L38339\_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC



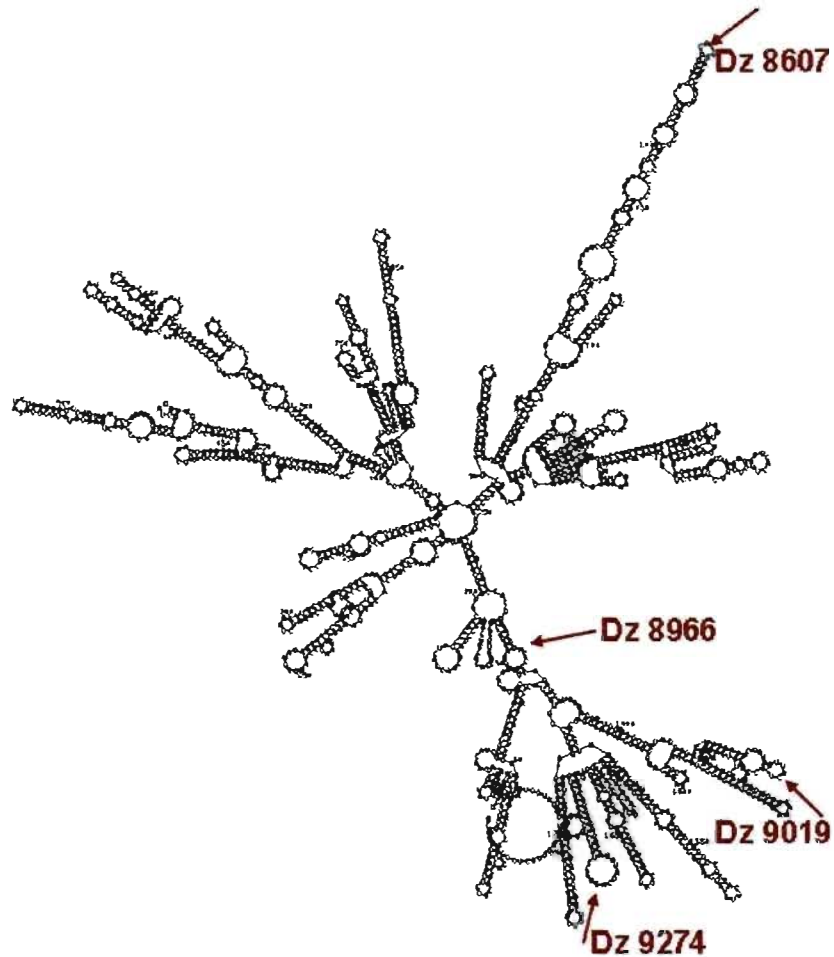
```

6a.VN.VN506.D88469_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6a.VN.VN538.D88473_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6a.VN.VN569.D88475_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6a.VN.VN571.D88476_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6b.TH.TH580.D37841_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCATCCTGGCAC
6b._.NB56.AY231583_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCATCCTGGCAC
6c.TH.TH846.D37843_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6d.VN.VN235.D88467_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAT
6e.VN.VN540.D88474_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6e.VN.VN787.D88477_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6e.VN.VN843.D88478_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6e.VN.VN998.D31971_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6f.TH.TH271.D37844_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCAC
6f.TH.TH552.D37845_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCAC
6f.TH.TH571.D38078_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCAC
6f.TH.TH976.D37846_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCAC
6g.ID.JK046.D49748_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6g.ID.JK065.D49751_ GGTGCTCCTTTACTATCTTCCTTTGGCAC
6g.ID.JK148.D49758_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6h.FR.FR1.L38331_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTAGCAC
6h.VN.VN004.D88465_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6h.VN.VN085.D88466_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6i.TH.TH555.D37849_ GGTGCTCTTTCTCTATTTTCATTTGGCAC
6i.TH.TH602.D37850_ GGTGCTCTTTCTCTATTTTCATTTGGCAC
6j.TH.TH553.D37848_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCATTTGGCAC
6k.CN.KM45.AY878650_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6k.VN.VN405.D88468_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6l.VN.VN507.D88470_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6l.VN.VN530.D88471_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6l.VN.VN531.D88472_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6m.TH.B4/92.D63943_ GGTGCTCCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6n.TH.D97/93.D63946_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC
6o.CA.QC30.U52811_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTTCTTTGGCAC
6p.VN.VN4.L38341_ GGNTGCTCTTTCTCTATCTTNCCTTTGGCAC
6p.VN.VN12.L38340_ GGTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTTGGCAC

```

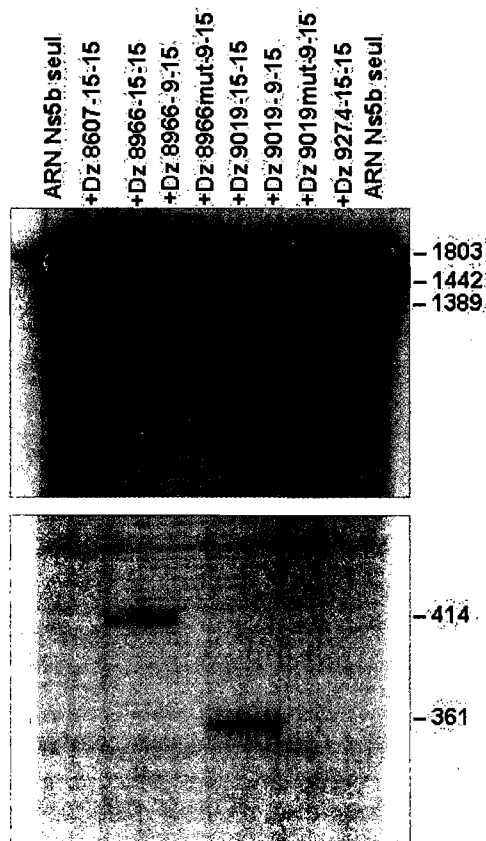
**Figure 15.** Alignement des séquences du VHC reconnues par Dz858-15-15. La banque de donnée de Los Alamos a été utilisée pour performer des alignements pour les génotypes de référence de 2005 sur la séquence de la capsid. La région reconnue par Dz858-15-15 a ensuite été alignée et chaque nucléotide a été analysé manuellement. Les génotypes sont indiqués à la gauche des séquences. Les nucléotides reconnus par la mutation A/G de Dz858 sont indiqués en vert. Les mutations générant un wobble (C muté pour U) sont indiquées en bleu. Les mutations pouvant affecter la liaison du Dz858 sont indiquées en rouge.

## 11. Repliement bidimensionnel de l'ARN représentant la polymérase virale du VHC.



**Figure 16.** Repliement bidimensionnel de l'ARN du VHC. Le programme Mfold a été utilisé pour analyser le repliement des nucléotides 3601 à la fin du génome du VHC. La région de la polymérase a été analysée afin d'identifier des régions simple brin comme cibles potentielles pour des désoxyribozymes. Le motif '10-23' a été utilisé pour dessiner quatre désoxyribozymes ciblant des boucles simple brin dans la région de la polymérase virale aux positions 8607, 8966, 9019 et 9274 du génome.

## 12. Coupure biochimique de l'ARN de la polymérase virale par différents désoxyribozymes non modifiés.



**Figure 17.** Coupure biochimique de l'ARN de la polymérase du VHC marquée au  $P^{32}$  par différents désoxyribozymes. Le substrat d'ARN de 1803 nt représentant la séquence de la polymérase a été généré par une méthode similaire à celle décrite dans la figure 8. Plus précisément, la région de la polymérase a été amplifiée par PCR à partir de pGEM-7Zf-HCV. Les amorces de PCR utilisées étaient 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCGATGCTGCTCAATGTCCTACACA-3', contenant le promoteur de la polymérase T7, et 5'TGTTTLAGCTCCCCGTTTCATC-3'. L'ARN marqué radioactivement a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g de cDNA. La réaction de coupure a été effectuée en utilisant 200 nM d'ARN radioactif et 4  $\mu$ M de Dz pendant 1 h à 37°C dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 et 10 mM de  $MgCl_2$ .

### 13. Séquences des désoxyribozymes synthétisés contre la polymérase virale.

Désoxyribozyme	Séquence
Dz8607-15-15	5' TAGTCATAGCCTCCG GGCTAGCTACAACGA GAAGACTCGTAGGCT-3'
Dz8966-9-15	5' GATCTGAGG GGCTAGCTACAACGA AGGTCAAGTGGCTCA-3'
mtDz8966-9-15	5' GATCTGAGG GGCGAGCTACAACGA AGGTCAAGTGGCTCA-3'
Dz8966-15-15	5' TTCAATGATCTGAGG GGCTAGCTACAACGA AGGTCAAGTGGCTCA-3'
Dz9019-9-15	5' CCTGGAGAG GGCTAGCTACAACGA AACTATGGAGTGAAA-3'
mtDz9019-9-15	5' CCTGGAGAG GGCGAGCTACAACGA AACTATGGAGTGAAA-3'
Dz9019-15-15	5' ATCTCACCTGGAGAG GGCTAGCTACAACGA AACTATGGAGTGAAA-3'
Dz9274-15-15	5' GCACGAGACAGGCTG GGCTAGCTACAACGA GATATATGTCTCCCC-3'

**Tableau III.** Séquence des désoxyribozymes synthétisés contre la polymérase du VHC. Les désoxyribozymes ne contiennent aucune modification et ont été purifiés par HPLC. Les désoxyribozymes efficaces ont été synthétisés avec différentes longueurs de bras et des contrôles contenant un domaine catalytique muté (mt).

### 14. Exemple d'alignement de séquences de la polymérase virale du VHC.

**Figure 18.** Alignement de séquences de la polymérase du VHC. Le programme Clustal W a été utilisé pour analyser 200 séquences du VHC, tout génotype confondu. Voici un exemple d'alignement de 25 séquences. Les séquences reconnues par les différents désoxyribozymes ont été indiquées.

CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: D:JanieFasta.NS5bgene.1-25.ps

Date: Wed Oct 09 14:17:19 2002

Page 1 of 6

Multiple sequence alignment for NS5B-HPCCGENOM, NS5B-AF207772, NS5B-AF1650574, NS5B-AF165058, NS5B-AF165062, NS5B-AF165061, NS5B-AF045702.1, NS5B-AF207753, NS5B-AB049088.1, NS5B-AB049091.1, NS5B-AB049093.1, NS5B-AF044867.1, NS5B-AF207756, NS5B-D85516.1, NS5B-AF165060, NS5B-AF165059, NS5B-HC016362, NS5B-HPCVND, NS5B-HPVHCVN, NS5B-HCMOUNIR, NS5B-AF333324, NS5B-HPCHUMR, NS5B-AF139594, NS5B-S62220, NS5B-AB049098.1, NS5B-AF207774. Includes ruler from 1 to 150.



Multiple sequence alignment for NS5B-HPCCGENOM, NS5B-AF207772, NS5B-AF1650574, NS5B-AF165058, NS5B-AF165062, NS5B-AF165061, NS5B-AF045702.1, NS5B-AF207753, NS5B-AB049088.1, NS5B-AB049091.1, NS5B-AB049093.1, NS5B-AF044867.1, NS5B-AF207756, NS5B-D85516.1, NS5B-AF165060, NS5B-AF165059, NS5B-HC016362, NS5B-HPCVND, NS5B-HPVHCVN, NS5B-HCMOUNIR, NS5B-AF333324, NS5B-HPCHUMR, NS5B-AF139594, NS5B-S62220, NS5B-AB049098.1, NS5B-AF207774. Includes ruler from 160 to 300.



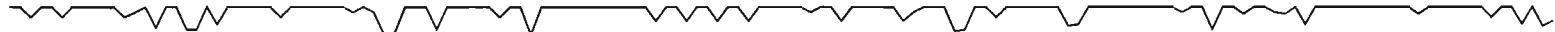


CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: D:JanieFasta.NS5bgene.1-25.ps
Page 3 of 6

Date: Wed Oct 09 14:17:19 2002

NS5B-HPCCGENOM 750
NS5B-AF207772 750
NS5B-AF1650574 750
NS5B-AF165058 750
NS5B-AF165062 747
NS5B-AF165061 747
NS5B-AY045702.1 750
NS5B-AF207753 750
NS5B-AB049088.1 750
NS5B-AB049091.1 750
NS5B-AB049093.1 750
NS5B-AY044867.1 750
NS5B-AF207756 750
NS5B-D85516.1 750
NS5B-AF165060 750
NS5B-AF165059 750
NS5B-BCU16362 747
NS5B-HPUNKCDS 747
NS5B-HPVBCVN 750
NS5B-HCVMOUNIR 750
NS5B-AF333324 750
NS5B-HPCHUMR 750
NS5B-AF139594 750
NS5B-S62220 750
NS5B-AB049098.1 750
NS5B-AF207774 750
ruler 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750



NS5B-HPCCGENOM 900
NS5B-AF207772 900
NS5B-AF1650574 900
NS5B-AF165058 900
NS5B-AF165062 897
NS5B-AF165061 897
NS5B-AY045702.1 900
NS5B-AF207753 900
NS5B-AB049088.1 900
NS5B-AB049091.1 900
NS5B-AB049093.1 900
NS5B-AY044867.1 900
NS5B-AF207756 900
NS5B-D85516.1 900
NS5B-AF165060 900
NS5B-AF165059 900
NS5B-BCU16362 897
NS5B-HPUNKCDS 897
NS5B-HPVBCVN 900
NS5B-HCVMOUNIR 900
NS5B-AF333324 900
NS5B-HPCHUMR 900
NS5B-AF139594 900
NS5B-S62220 900
NS5B-AB049098.1 900
NS5B-AF207774 900
ruler 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

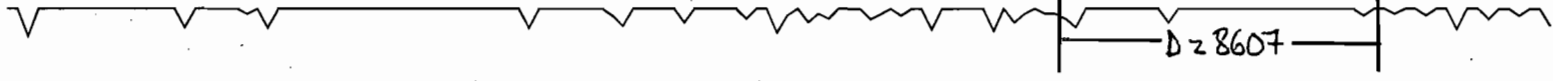


CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: D:JanieFasta.NS5bgene.1-25.ps
Page 4 of 6

Date: Wed Oct 09 14:17:19 2002

NS5B-HPCCGNOM 1050
NS5B-AF207772 1050
NS5B-AF1650574 1050
NS5B-AF165058 1050
NS5B-AF165062 1047
NS5B-AF165061 1047
NS5B-AY045702.1 1050
NS5B-AF207753 1050
NS5B-AB049088.1 1050
NS5B-AB049091.1 1050
NS5B-AB049093.1 1050
NS5B-AY044867.1 1050
NS5B-AF207756 1050
NS5B-D85516.1 1050
NS5B-AF165060 1050
NS5B-AF165059 1050
NS5B-HC016362 1047
NS5B-HPVCHVDS 1047
NS5B-HPVHCNS 1050
NS5B-HCVMOUINR 1050
NS5B-AF333324 1050
NS5B-HPCHUMR 1050
NS5B-AF139594 1050
NS5B-862220 1050
NS5B-AB049098.1 1050
NS5B-AF207774 1050
ruler 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050



NS5B-HPCCGNOM 1200
NS5B-AF207772 1200
NS5B-AF1650574 1200
NS5B-AF165058 1200
NS5B-AF165062 1197
NS5B-AF165061 1197
NS5B-AY045702.1 1200
NS5B-AF207753 1200
NS5B-AB049088.1 1200
NS5B-AB049091.1 1200
NS5B-AB049093.1 1200
NS5B-AY044867.1 1200
NS5B-AF207756 1200
NS5B-D85516.1 1200
NS5B-AF165060 1200
NS5B-AF165059 1200
NS5B-HC016362 1197
NS5B-HPVCHVDS 1197
NS5B-HPVHCNS 1200
NS5B-HCVMOUINR 1200
NS5B-AF333324 1200
NS5B-HPCHUMR 1200
NS5B-AF139594 1200
NS5B-862220 1200
NS5B-AB049098.1 1200
NS5B-AF207774 1200
ruler 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200



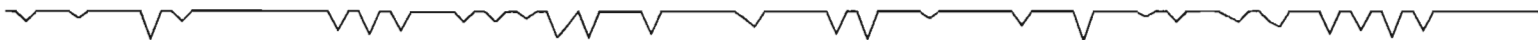


# CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

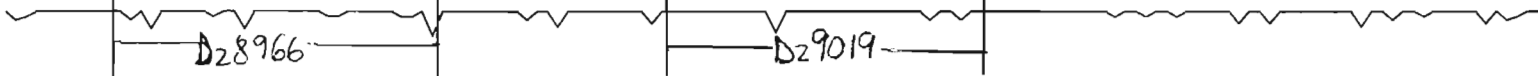
File: D:JanieFasta.NS5bgene.1-25.ps  
Page 5 of 6

Date: Wed Oct 09 14:17:19 2002

```
NS5B-HPCCGENOM 1350
NS5B-AF207772 1350
NS5B-AF1650574 1350
NS5B-AF165058 1350
NS5B-AF165062 1347
NS5B-AF165061 1347
NS5B-AY045702.1 1350
NS5B-AF207753 1350
NS5B-AB049088.1 1350
NS5B-AB049091.1 1350
NS5B-AB049093.1 1350
NS5B-AY044867.1 1350
NS5B-AF207756 1350
NS5B-D85516.1 1350
NS5B-AF165060 1350
NS5B-AF165059 1350
NS5B-HCU16362 1347
NS5B-HPCHUMR 1347
NS5B-HPVHCYN 1350
NS5B-HCVMOUNIR 1350
NS5B-AF333324 1350
NS5B-HPCHUMR 1350
NS5B-AF139594 1350
NS5B-S62220 1350
NS5B-AB049098.1 1350
NS5B-AF207774 1350
ruler .....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350
```



```
NS5B-HPCCGENOM 1500
NS5B-AF207772 1500
NS5B-AF1650574 1500
NS5B-AF165058 1500
NS5B-AF165062 1497
NS5B-AF165061 1497
NS5B-AY045702.1 1500
NS5B-AF207753 1500
NS5B-AB049088.1 1500
NS5B-AB049091.1 1500
NS5B-AB049093.1 1500
NS5B-AY044867.1 1500
NS5B-AF207756 1500
NS5B-D85516.1 1500
NS5B-AF165060 1500
NS5B-AF165059 1500
NS5B-HCU16362 1497
NS5B-HPCHUMR 1497
NS5B-HPVHCYN 1500
NS5B-HCVMOUNIR 1500
NS5B-AF333324 1500
NS5B-HPCHUMR 1500
NS5B-AF139594 1500
NS5B-S62220 1500
NS5B-AB049098.1 1500
NS5B-AF207774 1500
ruler .....1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500
```



CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: D:JanieFasta.NS5bgene.1-25.ps
Page 6 of 6

Date: Wed Oct 09 14:17:19 2002

NS5B-HPCCGENOM 1650
NS5B-AF207772 1650
NS5B-AF1650574 1650
NS5B-AF165058 1650
NS5B-AF165062 1647
NS5B-AF165061 1647
NS5B-AY045702.1 1650
NS5B-AF207753 1650
NS5B-AB049088.1 1650
NS5B-AB049091.1 1650
NS5B-AB049093.1 1650
NS5B-AY044867.1 1650
NS5B-AF207756 1650
NS5B-D85516.1 1650
NS5B-AF165060 1650
NS5B-AF165059 1650
NS5B-HC016362 1647
NS5B-HPCUNKCDS 1647
NS5B-HPVHCYN 1650
NS5B-HCVMOUNIR 1650
NS5B-AF333324 1650
NS5B-HPCHUMR 1650
NS5B-AF139594 1650
NS5B-S62220 1650
NS5B-AB049098.1 1650
NS5B-AF207774 1650
ruler 1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620.....1630.....1640.....1650



NS5B-HPCCGENOM 1773
NS5B-AF207772 1772
NS5B-AF1650574 1772
NS5B-AF165058 1772
NS5B-AF165062 1770
NS5B-AF165061 1770
NS5B-AY045702.1 1773
NS5B-AF207753 1772
NS5B-AB049088.1 1772
NS5B-AB049091.1 1773
NS5B-AB049093.1 1773
NS5B-AY044867.1 1773
NS5B-AF207756 1773
NS5B-D85516.1 1772
NS5B-AF165060 1773
NS5B-AF165059 1773
NS5B-HC016362 1770
NS5B-HPCUNKCDS 1770
NS5B-HPVHCYN 1772
NS5B-HCVMOUNIR 1773
NS5B-AF333324 1773
NS5B-HPCHUMR 1773
NS5B-AF139594 1773
NS5B-S62220 1773
NS5B-AB049098.1 1773
NS5B-AF207774 1773
ruler 1660.....1670.....1680.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740.....1750.....1760.....1770.....



Dz 9274

**15. Article de revue.**

L'article suivant consiste en une revue sur le potentiel thérapeutique des molécules antisens contre le VHC. Les oligonucléotides antisens, les ribozymes, les désoxyribozymes, l'ARN interférence et les aptamères sont comparés quant à leur mécanisme d'action et leur potentiel thérapeutique contre le virus de l'hépatite C. Les principales modifications chimiques et les moyens de livraison des molécules sont aussi discutés. Cet article de revue contient plusieurs éléments supplémentaires à l'introduction de cette thèse.

## Review

# Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection

Janie B Trepanier<sup>1</sup>, Jerome E Tanner<sup>2</sup> and Caroline Alfieri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Sainte-Justine Hospital Research Centre, and the Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>TanTec Biosystems Inc., Dollard-des-Ormeaux, Québec, Canada

\*Corresponding author: Tel: +1 514 345 4931 ext. 6135; Fax: +1 514 345 4801; E-mail [REDACTED]

The hepatitis C virus (HCV) is the cause of a silent pandemic that, due to the chronic nature of the disease and the absence of curative therapy, continues to claim an ever-increasing number of lives. Current antiviral regimens have proven largely unsatisfactory for patients with HCV drug-resistant genotypes. It is therefore important to explore alternative therapeutic stratagems whose mode of action allows them to bypass viral resistance. Antisense oligonucleotides, ribozymes, small interfering RNAs, aptamers and deoxyribozymes constitute classes of

oligonucleotide-based compounds designed to target highly conserved or functionally crucial regions contained within the HCV genome. The therapeutic expectation for such compounds is the elimination of HCV from infected individuals. Progress in oligonucleotide-based HCV antivirals towards clinical application depends on development of nucleotide designs that bolster efficacy while minimizing toxicity, improvement in liver-targeting delivery systems, and refinement of small-animal models for preclinical testing.

## Introduction

Infection by the hepatitis C virus (HCV) afflicts a staggering 170 million individuals worldwide, which is five-fold greater than the number of people infected by the HIV [1]. The rate of spontaneous virus clearance after acute infection is not known but is conservatively estimated to be 20% to 25% [2,3]. Other factors which seem to markedly influence the rate of spontaneous viral clearance are linked to host-specific determinants including the age, sex and underlying immune competency of the individual [2]. Failure to clear the infection can result in chronic liver inflammation, liver fibrosis, hepatocellular carcinoma or total liver failure [4,5]. Consequently, HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma have become the leading causes of liver transplantation in developed countries [6].

Current treatment for chronically infected individuals consists of 24 weekly injections of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) combined with oral ribavirin [7]. Treatment outcome with this regime yields a 54–56% sustained virological response (SVR). However, success in virus eradication is strongly influenced by the infecting virus genotype (higher SVR rates were seen with genotypes 2 and 3 compared with genotype 1) and by patient variables, including baseline viral load, age, weight and degree of liver fibrosis [8–11]. A major drawback seen with this course of therapy is that

many patients experience drug-induced side effects such as anaemia and fatigue, which often lead to discontinuation of therapy [12].

Although alternative therapeutic stratagems for HCV are undergoing pre-clinical and clinical testing, and include vaccines or compounds that attempt to prevent infection by inhibiting viral protein processing or viral RNA replication [9,13], many of these prospective candidates will likely succumb to ensuing drug resistance due to the high rates of mutation typical of HCV [14]. It is important, therefore, to explore new options for HCV therapy, particularly those that can bypass viral resistance [15]. Viral RNA is of central importance in HCV propagation, and it has been observed that HCV RNA has a propensity for mutation. HCV RNA has therefore served as an appealing, yet elusive, drug target. A recent strategy in the treatment of HCV infection is the use of synthetic RNA or DNA oligonucleotides that attempt to block viral RNA translation or to promote the accelerated destruction of viral RNA. These nucleotide-based compounds are easily synthesized and can be custom designed to suit individual HCV RNA sequences. Oligonucleotide-based drugs have already shown promise in the suppression of several deleterious oncogenes both *in vitro* and in animal models, and many

are currently in clinical testing in the form of antisense oligonucleotides (ASOs) [16], RNA or DNA enzymes referred to as ribozymes (Rz) and deoxyribozymes (Dz), respectively [17], small interfering RNAs (siRNAs) [18] and aptamers [19]. Each of these oligonucleotide-based platforms has individual advantages and disadvantages as well as distinct mechanisms of action which may advance or hinder its entry into the clinic (Figure 1). The aim of this review is to assess the use of each of these five platforms in reducing or altering HCV viral load or gene expression, and to examine their progression towards clinical use.

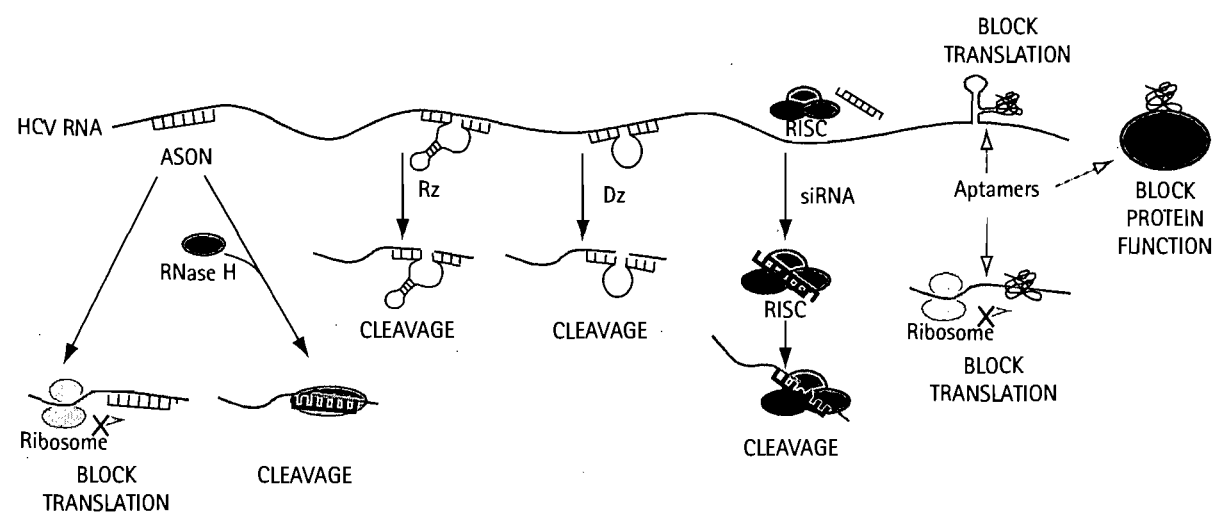
### The HCV genomic target

HCV is a member of the *Flaviviridae* and, like other viruses within this family, contains a single positive-stranded RNA molecule within its virion [20]. HCV has been divided into six major genotypes based on a nucleotide sequence divergence of over 30% between groups, and further subdivided into at least 52 subtypes, which differ from each other by 20–25% [21]. Infected individuals also harbour their own unique mix of heterogeneous HCV commonly referred to as quasispecies, which are the result of continual genetic changes arising from the replication of the founder virus [21]. This high degree of genomic variability seen both within and between the various groups is due in part to the absence of proofreading activity in the HCV RNA polymerase [22].

HCV virion RNA is approximately 9.6-kilobases and comprised of one large open reading frame (ORF) flanked by two highly conserved untranslated region sequences referred to as UTRs (Figure 2) [23]. Upon translation of the ORF, the resulting polypeptide is cleaved into individual viral proteins by viral and cellular peptidases, yielding a total of ten structural and non-structural (NS) proteins (Figure 2). Recently, an ORF expressed from an alternate reading frame contained within the HCV core protein coding sequence has been discovered that expresses a protein of unknown function referred to as the frameshift protein or protein F (Figure 2) [24–26].

In order for oligonucleotide therapy to be effective in recognizing the myriad of possible HCV genotype variants, it is imperative that the HCV RNA target be highly conserved in all virus types and that it remains immutable. Computer analysis of the HCV genome reveals that the 5'-UTR is highly conserved and that it consists of four major structural domains. Three of the four domains contribute to the internal ribosome entry site (IRES) activity [27]. The IRES is involved in the atypical binding of the 40S ribosomal subunit-eIF3 complex and cap-independent initiation of translation [28]. The RNA segment within the IRES, designated III<sub>d</sub>, is a particularly attractive target for oligonucleotide-based therapeutics as it is directly involved in the binding of the cellular 40S ribosomal subunit and appears invariant among all known HCV genotypes [29–31].

Figure 1. Principle mechanisms of action for oligonucleotide therapeutics



Antisense oligonucleotides (ASOs) block RNA translation or induce cellular RNase H. Ribozymes (Rz) and deoxyribozymes (Dz) directly bind and cleave the target RNA. Small interfering (si)RNAs incorporated into RNA-induced silencing complexes (RISCs) degrade complementary RNA. Aptamers bind directly to RNA or protein and inhibit RNA transcription/translation or protein function.

Analysis of the 3'-UTR of the HCV genome reveals a polyuridine stretch interspersed with cytosine nucleotides capable of forming a stable stem-loop structure. This stem-loop has an important role in the synthesis of the HCV negative RNA strand during virus replication and in the packaging of the HCV-positive RNA strand into the virion [32]. The stem-loop structure is adjacent to a highly conserved 98-nucleotide stretch designated as the X tail and constitutes the second most attractive target for oligonucleotide-based therapies [33]. In addition to the conserved regions in the 5'- and 3'-UTR segments, analysis of RNA sequences within the large ORF reveals several short yet highly conserved RNA sequences in the coding regions for the virus core protein and the RNA polymerase gene NS5B. Sequences contained within both of these regions have served as targets for nucleic-acid-based therapies [34-36].

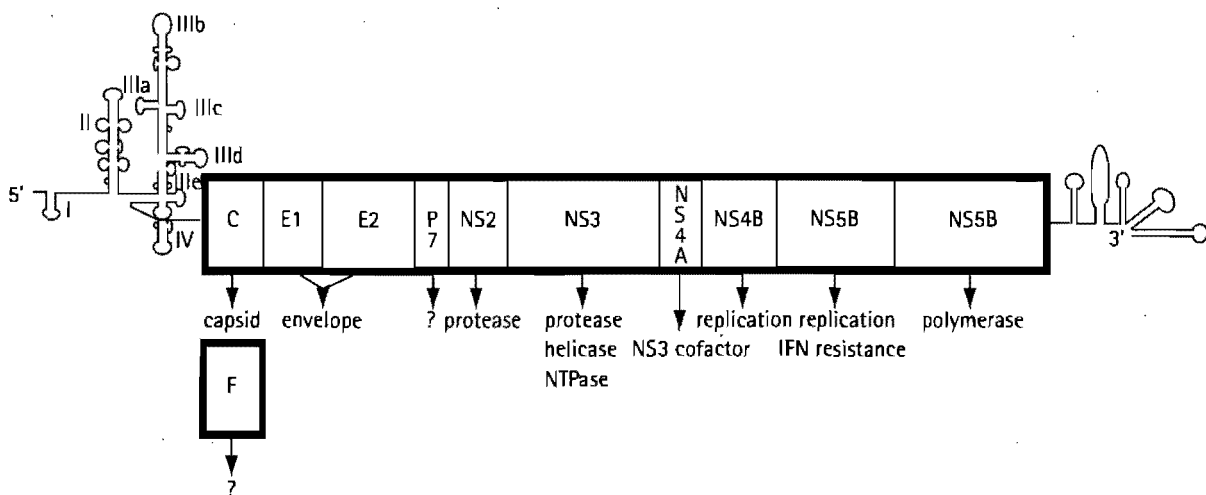
In addition to sequence conservation, an RNA target must also be accessible to oligonucleotides within a cell to permit proper oligonucleotide binding and possible enzymatic cleavage. Attempts to accurately predict *de novo* HCV RNA structures have been fraught with difficulty [37], as current efforts to correctly predict three-dimensional RNA structures based solely upon thermodynamic algorithms fail to take into account the involvement of cellular and viral proteins during the transcription, synthesis and virion packaging of HCV RNA. Although brute force 'gene walking' of the HCV genomic RNA is theoretically possible [38], whereby

conserved regions of the HCV RNA genome are systematically challenged with a series of homologous oligonucleotides, this approach is considered too expensive and labour intensive to justify its meagre success rate of 2-5% in identifying effective antisense candidates [37]. The more common stratagem to narrow the number of possible HCV targets uses database mining coupled with computer programs that predict possible RNA stem-loop structures [39]. In order to mitigate cell toxicity, this is usually done in parallel with a comparison of the oligonucleotide sequence and the human genome to avoid potential homology between the oligonucleotide and cellular RNAs or DNA [40].

Predicted HCV targets are verified for authentic open structures both *in vitro* and within a cell by use of scanning arrays, RNase H sensitivity mapping or RNase T1 footprinting [37,41,42]. One caveat when using RNase H to map oligonucleotide targets other than for antisense [43] is that RNase H mapping is limited in its ability to predict optimum target sites for Rz, Dz or siRNAs, as these agents do not anneal in the same fashion as ASONs, and their efficacy is influenced by other factors besides hybridization.

The verification of intracellular HCV RNA secondary structures by RNase H mapping is probably the most crucial step in the entire target identification process, as it must be proven that the HCV target sequence residing within a cell is accessible to the complementary oligonucleotide [44]. Until recently, the

Figure 2. Schematic representation of the hepatitis C virus genome



Predicted RNA secondary structures for the 5'- and 3'-UTR are shown. The major polyprotein, depicted by the large rectangular box, encodes the capsid (core) protein (C), the two envelope glycoproteins E1 and E2 and six non-structural (NS) proteins, NS2 through NS5B. The NS proteins form part of the viral replicative complex. Proteins P7 and frameshift protein F have no recognized function as depicted by the question marks.

development of oligonucleotide-based antivirals against HCV has been hindered by the lack of a robust *in vitro* culture system [45,46]. Although earlier systems were useful to study individual aspects of HCV replication, the level of viral replication proved unsatisfactorily low. As a first attempt to overcoming this obstacle, HCV replicon systems were introduced, which were based on the stable replication of sub-genomic selectable HCV RNAs (replicons) [47,48]. These initial experiments used HCV genomic cDNAs containing deletions in the HCV core, p7 or NS2 sequences combined with the selectable marker neomycin phosphotransferase, where HCV cDNA replication was driven by the IRES of the encephalomyocarditis virus (EMCV) and the selection marker was driven by the HCV IRES. The resulting construct was bicistronic with translation of the neomycin gene driven by the HCV IRES and translation of the HCV NS3-5B by the EMCV IRES. DNA construct transfection with clonal selection through neomycin sulphate resistance gave rise to cell clones that generated autonomously replicating HCV RNAs. Whereas initial clones proved unstable without continued drug selection, later clones containing adaptive mutations demonstrated improved HCV replication. The replicon system has been exploited to test the efficiency of ribozymes and siRNA candidates [49–52]; but one must be careful when interpreting the results as the RNA structure in the construct may not be representative of authentic HCV cellular RNA or replication. Although these subgenomic replicons replicate efficiently in cultured cells, infectious virus particles were not produced.

In order to overcome the obstacle of low virus production, intensive research by several laboratories led to an efficient set of HCV replication systems producing high levels of virus in cell culture [53–56]. These new systems are based on the observation that introduction of an *in vitro* transcribed RNA copy of HCV-2a strain JFH-1, or of the expression vector pTHr containing a full-length HCV-1b cDNA flanked by liver-active ribozyme sequences, results in robust replication of HCV in the liver hepatoma cell line Huh-7. These major breakthroughs will improve our understanding of *de novo* HCV RNA tertiary structures and hasten the identification of oligonucleotides capable of accessing stretches of viral RNA devoid of cellular or viral proteins. The ultimate goal is to provide a powerful tool for the development of oligonucleotide-based therapies against HCV which can be challenged with a complete and functional HCV genome in cell culture.

### Nucleotide format options

Watson–Crick base-pairing of oligonucleotides to their corresponding RNA target is the quintessential

mechanism of action for all oligonucleotide-based therapeutics. Numerous chemical modifications have been introduced into the nucleotide building blocks to increase base-pair affinity, target specificity and biological stability, while decreasing or preventing cell toxicity [57]. Nucleotide modifications have been grouped into four broad categories based upon changes in the nucleotide base, substitutions within the phosphate backbone, alterations of the ribose sugar, or introduction of molecular substitutes for both the ribose and phosphate backbone [57,58]. We will not attempt to discuss all the possible nucleotide designs reported in the scientific literature, but will restrict ourselves to those that have shown the most progress towards clinical application. Some of the more useful and commercially available nucleotide options are shown in Table 1.

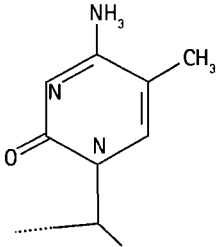
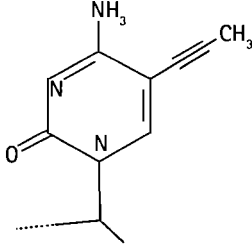
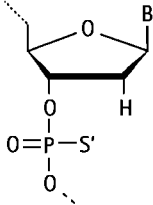
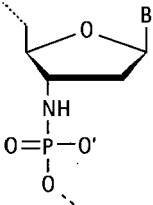
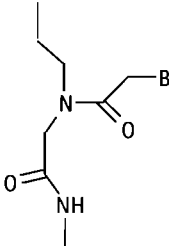
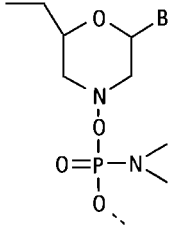
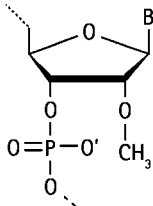
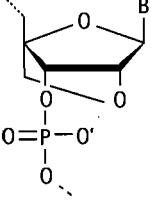
A relatively small number of base substitutions are commercially available and include C-5-propyne and methyl analogues of deoxycytidine and deoxythymidine (Table 1). These, along with amino-ethyl-3-acrylimido, methylthiazole, tricyclic dC analogues and 7-modified-7-deaza-purines have been shown *in vitro* to increase oligomer–RNA duplex stability by permitting better nucleotide base stacking compared with natural oligonucleotide sequences [59]. Very few evaluations of oligonucleotides containing base substitutions for *in vivo* or therapeutic use have been performed, so one cannot easily address their potential use in HCV therapy. Interested readers, however, can refer to the review by Herdewijn (2000) for further discussion on available base substitutions and their potential for therapeutic application [60].

Substitutions of the non-bridging oxygen atom by sulphur, as typified by phosphorothioate, or by a methyl group to yield methylphosphonate, are representative of a class of nucleotide substitutions within the phosphate backbone (Table 1). Of these two available choices, phosphorothioate is the most widely studied and applied nucleotide modification for clinical testing [61]. Phosphorothioate-linked oligonucleotides have the desirable properties of high solubility, long-lived nuclease resistance and high rate of cellular uptake [57,62]. Moreover, phosphorothioates efficiently recruit and activate endogenous RNase H, which in turn cleaves oligonucleotide-bound RNA [62]. While the sulphur substitution allows preservation of many of the properties of native DNA with the added benefit of increased oligonucleotide half-life, phosphorothioate-based oligonucleotides have unfortunately been shown to non-specifically bind blood components and cellular proteins [63], resulting in decreased pharmacokinetic (pK) profiles [57] and increased patient morbidity [64].

N3'→P5' phosphoramidates have been proposed as a therapeutic alternative to phosphorothioate, as the former display similar long-lived *in vivo* half-lives but are associated with less toxicity (Table 1) [57,65]. They have been exploited in both cell culture and *in vivo*

systems to block *c-myc* RNA translation [66,67] and to destroy leukaemic cells [57]. However, one should be aware that oligonucleotides containing phosphoramidate nucleotides do not activate RNase H [67]. In order to overcome this limitation chimeric oligonucleotides

Table 1. Representative list of commercially available nucleotides used in oligonucleotide therapy

Nucleotide site	Nucleotide modification
Base	
	
	5-Methyl-2'-deoxycytidine
	5-(1-Propynyl)-2'-deoxycytidine
Backbone	
	
	Phosphorothioate
	N3'→P5' phosphoramidate
Ring and backbone	
	
	Peptide nucleic acid
	Morpholino phosphoramidate
Furan ring	
	
	2'O-methyl
	Locked nucleic acid



can be used. Chimeric oligonucleotides contain a mixture of natural and modified nucleotides that preserve the beneficial properties of increased affinity, half-life and reduced toxicity while maintaining the RNase H inducing activity [69].

Other nucleotide options that increase oligonucleotide stability and half-life, while avoiding phosphorothioate toxicity, seek to eliminate the phosphodiester backbone altogether. These include peptide nucleic acids (PNAs) [70,71], and the more radical morpholino oligonucleotide design (Table 1) [72]. PNAs are achiral neutral molecules whose nucleotide backbone structure is similar to polypeptides. PNAs hybridize to DNA and RNA with greater specificity and binding properties compared with unmodified oligomers, and are resistant to endonucleases and exonucleases as well as proteases [73]. One major difficulty seen with PNAs is their low solubility and reduced cellular uptake, which may make therapeutic administration problematic [74,75]. Morpholino nucleotide analogues, by contrast, contain a six-membered morpholine ring instead of ribose, and a non-ionic phosphoramidate linkage in lieu of the phosphodiester bond. Phosphoramidate linkage gives rise to oligonucleotides with high affinity for single-stranded RNA [76]. Morpholino oligonucleotides, like many other nucleotide designs, do not recruit RNase H [77,78], and are used to block RNA translation. Some non-specific toxicity has been observed in animals when morpholino oligonucleotides were given in high dose [79]; however, very limited toxicity was noted when tested in humans [80]. Like PNAs, a major drawback of morpholino oligonucleotides is their chemical neutrality, which makes cellular uptake or incorporation into carrier molecules difficult. While the use of complementary bridge oligonucleotides comprising rapidly degraded natural DNA has been proposed as a means to overcome these issues [81], the inherent chemical neutrality of morpholino- or PNA-based oligonucleotides may delay their widespread implementation into the clinic [57,81].

The most prevalent modifications of the nucleotide ribose sugar are methyl- and methoxyethoxy additions to the 2'-OH position of the furan ring (Table 1) [82]. Alkyl additions shift the conformation of the sugar ring towards the C3'-endo conformation, which in turn predisposes the oligonucleotide structure to increased annealing and hybrid stability with the RNA target [58]. 2'-OH alkyl modifications also decrease nuclease sensitivity [83] and, in the case of 2'-methylthioethyl, is shown to bind to serum albumin, giving rise to enhanced biodistribution and pharmacokinetic properties [84]. Like many other nucleotide modifications, alkylated nucleotides lack the ability to recruit RNase H, a drawback that can be overcome through the use of chimeric oligonucleotides.

More exotic changes to the 2'-position of the ribose sugar include the locked nucleic acid (LNA) oligomers [85,86], wherein the ribonucleotide contains a methylene bridge connecting the 2'-oxygen of the ribose with the 4'-carbon [57,87,88] (Table 1). LNA oligomers offer the attractive properties of nuclease resistance, high target affinity, potent *in vivo* biological activity and an apparent lack of acute toxicity [57,89]. Unfortunately, LNAs induce conformational changes in the DNA-RNA duplex towards the A-type helix [61], which leads to inhibition of RNase H cleavage of the target RNA [90].

## ASONS

The use of ASON as a therapeutic was first proposed in 1978 when a 13-base oligonucleotide complementary to the long terminal repeat (LTR) of Rous sarcoma virus was used to inhibit viral replication [91,92]. Subsequently, other laboratories have successfully used ASONS to block expression of deleterious genes or to arrest viral replication *in vitro* [16]. While initial enthusiasm for ASON technology had predicted its use in the alleviation of numerous human diseases, the results to date have been disappointing; with only one marketed ASON, Vitravene™, for use in the prevention of cytomegalovirus-associated retinitis [57,93]. With increased availability of newer chemical modifications, however, there is renewed interest in ASON therapeutics as seen by the ever-growing list of ASONS entering early-stage clinical trials [16].

ASONS are generally 12–26 bases in length and incorporate many of the nucleotide designs listed above. The mechanism of action of individual ASONS will vary depending on their backbone structure, whether RNase H is needed to degrade target RNA or whether steric blockage of RNA alone is required. Despite known phosphorothioate toxicity, most ASONS incorporate phosphorothioate to take advantage of its RNase H recruitment properties, its nuclease resistance and its ease in delivering ASONS into the cell [94]. After target degradation, the ASON is expected to recycle within the cell for continued binding and degradation of additional RNA targets. ASONS, which act by sterically blocking RNA processing, are generally synthesized with modifications that fail to recruit RNase H due to their lack of charge or helix-destabilizing properties. These ASONS rely on increased stability and target affinity for optimal function. They are designed to block RNA chain elongation, splicing, intracellular transport or translation. One generally selects this class of ASON versus those containing phosphorothioate for its greater target affinity and nuclease resistance as well as its more favourable pharmacokinetic and toxicity properties.

Inhibition of HCV replication by ASONs could in theory eliminate the virus from the cell since the HCV replication cycle is based entirely on RNA [20]. HCV, unlike HIV or other members of the retrovirus family, does not form a complementary DNA intermediate during its replicative cycle. Since HCV replication occurs within the cytoplasm and RNase H resides principally in the nucleus, ASONs designed to eliminate HCV cannot act through RNase H, but must rely on steric blockage to function. Most ASON designs target the highly conserved IRES IIIId loop in the 5'-UTR, as disruption of this region effectively interferes with HCV RNA transcription and replication [29,30,95–98]. Other popular IRES targets include the pyrimidine-rich tract found in domain II and the AUG codon in domain IV [99–110]. ASONs to these two domains are expected to obstruct HCV polyprotein synthesis. Less-considered ASON targets include conserved segments within the core protein coding region [35,36,107,111,112], the NS3 coding sequence [34] and the HCV 3'-X tail [43]. The only HCV ASON candidate currently in advanced clinical trial is ISIS 14803 (Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA) [101]. ISIS 14803 is complementary to the HCV translation initiation region within the IRES sequence [102]. In a Phase I clinical study performed with 28 chronically infected patients, only three of the 28 patients demonstrated significant HCV RNA reductions [101]. With the exception of increased levels of alanine transferase (ALT) in five patients, the safety profile of ISIS 14803 was similar to that of other phosphorothioate ASONs. Further studies to evaluate ISIS 14803 broader patient efficacy and the mechanisms of the ALT increases are necessary.

## Ribozymes

Rz are self-cleaving RNAs originally discovered by Cech and co-workers in *Tetrahymena thermophila* [113]. Natural Rz are classified into nine distinct groups based on their size and mechanism of action [114]. The hammerhead design is the most widely used for therapeutic applications [115]. The hammerhead RNA cleavage motif recognizes any NUH sequence in RNA, where H=U, C or A, for cleavage of the RNA downstream from the H nucleotide [116]. Synthetic hammerhead Rz designs contain a catalytic domain located between two annealing arms. The arms are engineered to allow for the recognition of any desired cellular or viral RNA sequence [117,118]. Upon cleavage, Rz release from their cellular RNA complement in order to be recycled for continued rounds of cleavage. The cleavage of cellular RNA renders it untranslatable and marked for rapid degradation by cellular nucleases.

Cellular expression of Rz is usually accomplished using a tissue-specific DNA expression vector. One advantage of Rz technology over ASONs is that the former directly cleaves its RNA target and does not require RNase H. This would constitute a distinct advantage considering that HCV replicates in the cytoplasm, whereas RNase H is localized in the nucleus. Like ASONs, most Rz designs target the highly conserved sequences within the 5'-UTR and 3'-UTR [119–125]; however, because of the many NUH sequences present throughout the HCV genome and the ability of Rz to cleave cytoplasmic RNA, core protein sequences [124,126,127] and other conserved regions within the HCV plus and minus RNA strands are also considered reasonable Rz targets that should reduce HCV RNA and viral protein expression [128,129].

In 2001 the Rz Heptazyme™ was the first HCV therapeutic to achieve Phase II clinical trial status [129–132]. Heptazyme is a 33 nucleotide Rz oligomer that targets the 5'-UTR of HCV. Heptazyme was well tolerated in healthy individuals and was found to be clinically beneficial in reducing the level of serum HCV in 10% of patients [130]. These results looked promising at the time, such that Heptazyme was considered as a possible replacement for ribavirin for use with IFN- $\alpha$ . Unfortunately, the unforeseen occurrence of blindness in a test animal treated with Heptazyme resulted in discontinuation of clinical trials, and a hold was placed on Heptazyme therapy [130].

## Interference RNAs

RNA interference (RNAi) is an emerging therapeutic strategy derived from an evolutionarily conserved mechanism, wherein the endogenous cellular enzyme Dicer cleaves double-stranded (ds) RNAs into small (~21 nucleotide) fragments [133,134]. These small dsRNAs then combine with cellular proteins to form the RNA-induced silencing complex (RISC), which is capable of binding and cleaving complementary RNA targets. As previous studies in mammalian cells have shown that dsRNAs greater than 30 nucleotides induce interferon and inhibit cellular protein synthesis [135], investigators prefer to use small synthetic dsRNA fragments, typically in the order of 21–23 bases, to suppress specific RNAs [136]. Tests using this small interfering RNA (siRNA) against various viral RNAs or against deleterious mRNAs have shown siRNAs to be both highly active and extremely specific in cultured cells and in animals [137–140], thereby prompting clinical testing [141,142].

Given the potential of siRNAs to eliminate HCV RNA in cells, several laboratories are exploring the use

of siRNAs for HCV therapy. Initial studies using siRNAs that recognize the NS5B RNA sequence revealed a 75% reduction in luciferase activity in mice when a HCV NS5B-luciferase chimeric mRNA was used as a target [143]. A more recent study using small hairpin inhibitory RNAs (shRNAs) directed against the HCV IRES reported a reduction in IRES-driven luciferase activity in mice by 94–98% [144]. Other studies using siRNAs that target the 5'-UTR, 3'-UTR, core, E2, NS3, NS4B or NS5A/B RNA segments have shown a reduction of synthetic HCV RNA by up to 80-fold [112,114,145–150] and a 98% elimination of HCV RNA in infected cells [148]. SiRNAs are known to be extremely sequence specific, and therefore the unsurprising but unfortunate reality is that the inhibitory action of siRNA can be abolished if challenged with a HCV variant whose sequence differs by one or more nucleotides [148].

Whether siRNAs will be used to treat chronically infected individuals harbouring HCV quasispecies remains to be tested. However, it was noted by Wilson *et al.* (2005) that a highly effective siRNA construct against the HCV NS5B coding sequence lost efficacy due to mutations in the HCV [151]. Sequence analysis revealed that siRNA-resistant HCV RNAs contained point mutations in the siRNA target sequence. Additional studies in other viral systems have shown that some viruses suppressed siRNA, raising concerns that HCV may also possess the ability to evade siRNA. Specifically, influenza E3L and NS1 proteins, adenovirus non-coding VA1 RNA and HIV tat protein were shown to suppress siRNA or subvert Dicer processing of dsRNAs in cells [152–154].

The examples cited above reveal the potential advantages and downfalls when considering siRNA as a HCV therapeutic. The expectation of low toxicity is certainly a positive consideration in development of this technology. Unfortunately, the long-term efficacy of siRNA-based treatment regimens remains suspect due to the potential generation of escape mutants capable of evading siRNA or to the direct suppression of siRNA activity by viral proteins [153,155].

## Aptamers

Aptamers are low-molecular-weight oligonucleotides that, due to their unique three-dimensional structure, exhibit binding specificity and affinities on par with monoclonal antibodies [156,157]. Aptamers are generated from random DNA libraries through a combination of high-throughput screening and an amplification process referred to as the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [156,158]. Aptamers can be engineered for therapeutic applications through the use of nucleotide modifications, as

discussed above [157,159]. They can be designed to recognize proteins or RNA molecules associated with a wide range of disease states, including HCV infection [19,160,161]. Aptamers recognizing and binding to HCV RNA-dependent RNA polymerase (NS5B), NS3 protein, 5'- and 3'-UTRs and the IRES domain were shown to inhibit HCV enzyme function or to block HCV RNA translation *in vitro* and in cultured cells [162–180]. Given their ability to target HCV proteins and HCV genomic RNA in a manner similar to small drug molecules, along with their demonstrated efficacy in cultured cells [165,176,177], aptamers targeting the IRES sequence, as well as the NS3 and NS5B sequences and associated proteins, will likely be test candidates for upcoming HCV clinical trials.

## Deoxyribozymes

An ideal oligonucleotide therapeutic for the treatment of HCV would combine the stability and affinity of ASONs with the ability of Rz to directly cleave cytoplasmic RNA. Dz constitute a new class of oligonucleotide therapeutics that in many ways mimic both ASON and Rz molecules. Like aptamers, Dz were originally created in the laboratory from a random library of DNA oligomers and screened for their ability to cleave a defined RNA target [181]. They measure 30–40 nucleotides in length and, similar to Rz, comprise a central catalytic core flanked by two short ASON annealing arms. Dz are classified as either type I or type II based on their catalytic domain nucleotide structure and their RNA target cleavage sequence [181]. Type I Dz contain a 13-base catalytic domain and cleave AA/G motifs, whereas type II Dz possess a 15-base catalytic domain and cleave AC/U or GC/U motifs [181]. Dz require the presence of a divalent cation such as magnesium to cleave the RNA target by transesterification [182]. RNA breakage occurs when the oxygen in the 2'-OH group of the furan ring serves as a nucleophile to attack the phosphorus of the adjacent phosphodiester linkage yielding a 2'-3'-cyclic phosphate and 5'-OH products. Inhibition of gene expression following Dz treatment is attributed to a combination of RNA cleaving activity and antisense inhibition via annealing of the Dz arms to their target sequences.

Dz demonstrate high sequence specificity and can be engineered to cleave virtually any large target RNA. Dz have several advantages over Rz and ASONs. They are more resistant to chemical and nuclease degradation upon chemical modification, are smaller and less expensive to synthesize, show superior flexibility in target choice compared to ASONs and are catalytically more efficient than Rz [114,183–185]. These attributes make them a very attractive platform for therapeutic

development. In fact, Dz are rapidly moving from their use as a research tool to becoming a fully-fledged pharmacological strategy for the treatment of various human diseases [114,118]. They have been shown in several animal models to reduce the expression of detrimental RNAs and to abrogate disease pathology [185–187]. Dz are currently in pre-clinical and early clinical development for the treatment of cancer [188] and genetic diseases [189], as well as for the management of infections such as HIV, hepatitis B and influenza [190–193].

The Dz technology has been tested *in vitro* and in cell culture to determine whether these molecules can decrease HCV RNA levels. Dz against the 5'-UTR was shown to significantly reduce the quantity of synthetic HCV RNA *in vitro* [194]. When used to cleave a chimeric RNA comprised the HCV IRES sequence and the luciferase gene, the Dz was shown to diminish luciferase expression in cultured liver cells by 45–67% [192]. Our laboratory has recently tested a series of Dz that recognize a conserved sequence within the core protein coding region, and found that they were able to reduce HCV RNA targets expressed in a hepatic cell line by up to 50% when measured 24 hours post-treatment by quantitative PCR [195]. Given their ability to cleave RNA without cellular cofactors, their ease in synthesis and their adaptability in incorporating nucleotide modifications for the purposes of increasing nuclease resistance and optimizing their pharmaceutical profile, Dz may soon become a very promising therapy for HCV treatment.

### Oligonucleotide delivery systems

Although many therapeutic oligonucleotides are administered as 'naked' molecules, the safe and efficient delivery of these nucleic acids to their target tissue remains a fundamental challenge [16,196]. The liver has several amenable attributes as a target organ for 'naked' oligonucleotide therapy [197]; however, past studies involving intravenous injection of 'naked' DNAs for hepatic targeting indicate that these oligonucleotides accumulate largely in nonparenchymal liver cells (approximately 80% in Kupffer cells and vascular endothelial cells) [118,198]. Hence it will be necessary to improve upon hepatocyte-specific delivery methods to ensure that most, if not all, HCV-infected hepatocytes are availed sufficient oligonucleotide.

Various viral-based vectors have been considered which encode and transport oligonucleotide-based prodrugs. However, growing safety concerns of adventitious contaminants present or produced during vector manufacture, such as endogenous viruses, prions and endotoxins, and the various immunological complications recently observed

following use of such virus-based vectors, has prompted researchers to steer towards nonviral, synthetic carriers as a safer alternative [199].

Liposomes may constitute an attractive delivery vehicle option based on their success in cell cultures; however, liposomes are seriously disadvantaged due to the toxicity incurred by their disruption of cell membranes [200–202]. Furthermore, when combined with nucleic acids, their large size and complex laminar structures may obstruct passage through vascular openings and into the interstitial fluids, or may generate problems during 'drug unloading' once inside the cell [197,203].

In order to address the biodistribution problem often encountered with 'naked' nucleic acids [198,204,205], and to enhance proper oligomer–hepatocyte interactions, one might consider the use of non-toxic biodegradable cationic polymers that incorporate the hepatoma-specific ligand  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, as this system has shown promising pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics as well as *in vivo* efficacy [206–208]. Many of the newer biodegradable cationic polymer designs also avoid the problem of poor biocompatibility often brought about by undergraded polymer [209–211] or use polyethylene glycol (PEG) to reduce polymer toxicity [211–216].

### One final hurdle

*In vivo* studies for HCV have been hampered by the lack of an appropriate animal infection model [217]. The ideal *in vivo* model for HCV infection would permit authentic virus interaction with human hepatocytes and human immune cells. However no current model possesses both of these characteristics [218]. The closest *in vivo* model that most closely mimics human infection is the chimpanzee. HCV infection of chimpanzees, however, usually results in mild hepatitis with ultimate viral clearance. This finding, coupled with the endangered species status and housing expense of chimpanzees, generally limits their use to testing in one or two animals, and then only if one is clearly considering human clinical trials.

Alternative models under investigation include the marmoset and tamarin primate species [219,220], as well as *Tupaia belangeri* [221]. The latter is a species of tree shrew that is infectable by HCV and develops many of the pathophysiological manifestations observed during acute HCV viraemia in humans. Unfortunately, difficulties in establishing large breeding colonies of these tree shrews have deterred their introduction into mainstream use. Alternatively, experimental infection of tamarins and marmosets by the closely related flavivirus GBV-B has been proposed as an appropriate study model that is expected to

mimic HCV acute infection in terms of how a flavivirus interacts with an intact immune system [218]. However, drawbacks include the limited availability of these animals and the fact that they require special housing.

Finally, transgenic murine models have been constructed to examine individual HCV proteins, and for use in *in vivo* testing of HCV drug candidates [218]. However, these animals are not natural HCV hosts and lack the ability to faithfully mimic human infection. Most recent attempts to adapt rodents for use as an HCV animal model use an albumin-promoter-driven plasminogen activator transgenic SCID mouse into which primary human hepatocytes are implanted to create chimeric livers [222,223]. These chimeric livers are infectable by HCV, as demonstrated by recoverable HCV from mouse blood [223]. If, as proposed by Guha *et al.* [218], the mice are implanted with human liver cells and then injected with human immune cells, the resulting murine system could allow for HCV infection of human liver cells and HCV antigen presentation to human immune cells in a systemic fashion. If successful, such a model would allow for the study of HCV liver pathology and the effects of HCV on various components of the human immune system during primary and chronic infection. Once completed, this SCID model might represent the most amenable small-animal model to study HCV disease pathology and to test whether oligonucleotide therapy can eliminate HCV from human liver cells.

## Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant # 48310 (to CA). JT is a recipient of doctoral studentships from the Sainte-Justine Hospital Foundation and the University of Montreal.

## References

- World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization [updated 2000 Oct; cited 2006 Apr 10] Fact sheet N°164: Hepatitis C. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>
- Chung, RT. Acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005; 41:S14–S17.
- Leone N, Rizzetto M. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51:31–46.
- Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132:296–305.
- Monto A, Wright TL. The epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2001; 28:441–449.
- Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26:S15–S20.
- Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 1972; 177:705–706.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975–982.
- Sookoian SC. New therapies on the horizon for hepatitis C. *Ann Hepatol* 2003; 2:164–170.
- Hughes CA, Shafran SD. Chronic hepatitis C virus management: 2000–2005 update. *Ann Pharmacother* 2006; 40:74–82.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358:958–961.
- Russo MW, Fried MW. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124:1711–1719.
- Hugle T, Cerny A. Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. *Rev Med Virol* 2003; 13:361–371.
- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:223–235.
- Walker MP, Appleby TC, Zhong W, Lau JY, Hong Z. Hepatitis C virus therapies: current treatments, targets and future perspectives. *Antivir Chem Chemother* 2003; 14:1–21.
- Crooke ST. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004; 55:61–95.
- Schubert S, Kurreck J. Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. *Curr Drug Targets* 2004; 5:667–681.
- Jana S, Chakraborty C, Nandi S, Deb JK. RNA interference: potential therapeutic targets. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65:649–657.
- Cerchia L, Hamm J, Libri D, Tavitiani B, de Francis V. Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett* 2002; 528:12–16.
- Moradpour D, Blum HE. A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver Int* 2004; 24:519–525.
- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus: 15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85:3173–3188.
- Zeuzem S. Hepatitis C virus: kinetics and quasispecies evolution during anti-viral therapy. *Forum (Genova)* 2000; 10:32–42.
- Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:4942–4946.
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 2005; 25:105–117.
- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001; 7:710–721.
- Xu Z, Choi J, Yen TS, *et al.* Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001; 20:3840–3848.
- Hellen CU, Pestova TV. Translation of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat* 1999; 6:79–87.
- Rijnbrand RC, Lemon SM. Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242:85–116.
- Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Murray MG, Lau JY, Doudna JA. The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol* 1999; 292:513–529.
- Martinand-Mari C, Lebleu B, Robbins I. Oligonucleotide-based strategies to inhibit human hepatitis C virus. *Oligonucleotides* 2003; 13:539–548.

31. Dasgupta A, Das S, Izumi R, Venkatesan A, Barat B. Targeting internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation to block hepatitis C and other RNA viruses. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234:189–199.
32. Yamada N, Tanihara K, Takada A, *et al.* Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 1996; 223:255–261.
33. Blight KJ, Kolykhalov AA, Reed KE, Agapov EV, Rice CM. Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets. *Antivir Ther* 1998; 3:71–81.
34. Heintges T, Encke J, zu PJ, Wands JR. Inhibition of hepatitis C virus NS3 function by antisense oligodeoxynucleotides and protease inhibitor. *J Med Virol* 2001; 65:671–680.
35. Lima WF, Brown-Driver V, Fox M, Hanecak R, Bruce TW. Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J Biol Chem* 1997; 272:626–638.
36. Liu Y, Chen Z, He N. Inhibition of hepatitis C virus by antisense oligodeoxynucleotide *in vitro*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1997; 77:567–570.
37. Sohail M, Southern EM. Selecting optimal antisense reagents. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44:23–34.
38. Smith L, Andersen KB, Hovgaard L, Jaroszewski JW. Rational selection of antisense oligonucleotide sequences. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11:191–198.
39. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3406–3415.
40. Patzel V, Steidl U, Kronenwett R, Haas R, Sczakiel G. A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:4328–4334.
41. Gewirtz AM. Oligonucleotide therapeutics for human leukaemia. *Ciba Found Symp* 1997; 209:169–191.
42. Sioud M, Leirdal M. Design of nuclease resistant protein kinase c alpha DNA enzymes with potential therapeutic application. *J Mol Biol* 2000; 296:937–947.
43. Smith RM, Walton CM, Wu CH, Wu GY. Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol* 2002; 76:9563–9574.
44. Scherr M, Rossi JJ, Sczakiel G, Patzel V. RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:2455–2461.
45. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, *et al.* Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002; 76:4008–4021.
46. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290:1972–1974.
47. Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001; 52:1–17.
48. Bartenschlager R, Kaul A, Sparacio R. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Res* 2003; 60:91–102.
49. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:2014–2018.
50. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, *et al.* RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:2783–2788.
51. Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:235–240.
52. Jarczak D, Korf M, Beger C, Manns MP, Kruger M. Hairpin ribozymes in combination with siRNAs against highly conserved hepatitis C virus sequence inhibit RNA replication and protein translation from hepatitis C virus subgenomic replicons. *FEBS J* 2005; 272:5910–5922.
53. Heller T, Saito S, Auerbach J, *et al.* An *in vitro* model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2579–2583.
54. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623–626.
55. Zhong J, Gastaminza R, Cheng G, *et al.* Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:9294–9299.
56. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11:791–796.
57. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003; 270:1628–1644.
58. Gallo M, Montserrat JM, Iribarren AM. Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:143–151.
59. Freier SM, Altmann KH. The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure–stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4429–4443.
60. Herdewijn P. Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10:297–310.
61. Eckstein F. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10:117–121.
62. Zamaratski E, Pradeepkumar PI, Chattopadhyaya J. A critical survey of the structure–function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 48:189–208.
63. Stein CA. Antitumor effects of antisense phosphorothioate c-myc oligodeoxynucleotides: a question of mechanism. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:391–393.
64. Henry SP, Grillone LR, Orr JL, Bruner RH, Kornbrust DJ. Comparison of the toxicity profiles of ISIS 1082 and ISIS 2105, phosphorothioate oligonucleotides, following subcutaneous intradermal administration in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 1997; 116:77–88.
65. Gryaznov S, Skorski T, Cucco C, *et al.* Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as antisense agents. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:1508–1514.
66. Faria M, Spiller DG, Dubertret C, *et al.* Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2001; 19:40–44.
67. Skorski T, Perrotti D, Nieborowska-Skorska M, Gryaznov S, Calabretta B. Antileukemia effect of c-myc N3'→P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3966–3971.
68. Gryaznov SM. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as potential therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:131–140.
69. Agrawal S. Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:53–68.
70. Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 2002; 41:4503–4510.
71. Pooga M, Land T, Bartfai T, Langel U. PNA oligomers as tools for specific modulation of gene expression. *Biomol Eng* 2001; 17:183–192.
72. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; 7:187–195.
73. Nielsen PE. Antisense peptide nucleic acids. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2:282–287.

74. Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:159–166.
75. Sazani P, Gemignani F, Kang SH, et al. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol* 2002; 20:1228–1233.
76. Urban E, Noe CR. Structural modifications of antisense oligonucleotides. *Farmaco* 2003; 58:243–258.
77. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:31–44.
78. Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:141–158.
79. Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* 2002; 243:209–214.
80. Iversen PL, Arora V, Acker AJ, Mason DH, Devi GR. Efficacy of antisense morpholino oligomer targeted to c-myc in prostate cancer xenograft murine model and a Phase I safety study in humans. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2510–2519.
81. Morcos PA. Achieving efficient delivery of morpholino oligos in cultured cells. *Genesis* 2001; 30:94–102.
82. Jason TL, Koropatnick J, Berg RW. Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 201:66–83.
83. Cummins LL, Owens SR, Risen LM, et al. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:2019–2024.
84. Prakash TP, Manoharan M, Kawasaki AM, et al. 2'-O-[2-(methylthio)ethyl]-modified oligonucleotide: an analogue of 2'-O-[2-(methoxy)ethyl]-modified oligonucleotide with improved protein binding properties and high binding affinity to target RNA. *Biochemistry* 2002; 41:11642–11648.
85. Jepsen JS, Sorensen MD, Wengel J. Locked nucleic acid: a potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology. *Oligonucleotides* 2004; 14:130–146.
86. Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* 2003; 21:74–81.
87. Elayadi AN, Corey DR. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2:558–561.
88. Orum H, Wengel J. Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3:239–243.
89. Elayadi AN, Braasch DA, Corey DR. Implications of high-affinity hybridization by locked nucleic acid oligomers for inhibition of human telomerase. *Biochemistry* 2002; 41:9973–9981.
90. Bondensgaard K, Petersen M, Singh SK, et al. Structural studies of LNA:RNA duplexes by NMR: conformations and implications for RNase H activity. *Chemistry* 2000; 6:2687–2695.
91. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:285–288.
92. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:280–284.
93. Holmlund JT. Applying antisense technology: Affinitak and other antisense oligonucleotides in clinical development. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1002:244–251.
94. Neary CL, Cho-Chung YS. Nuclear translocation of the catalytic subunit of protein kinase A induced by an antisense oligonucleotide directed against the R1alpha regulatory subunit. *Oncogene* 2001; 20:8019–8024.
95. Alt M, Renz R, Hofschneider PH, Paumgartner G, Caselmann WH. Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology* 1995; 22:707–717.
96. Wu CH, Wu GY. Targeted inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression in human hepatoma cell lines. *Gastroenterology* 1998; 114:1304–1312.
97. Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 2000; 7:1105–1110.
98. Tallet-Lopez B, Aldaz-Carroll L, Chabas S, Dausse E, Staedel C, Toulme JJ. Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIc of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent *in vitro* translation. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:734–742.
99. Alt M, Renz R, Hofschneider PH, Caselmann WH. Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation. *Arch Virol* 1997; 142:589–599.
100. Alt M, Eisenhardt S, Serwe M, Renz R, Engels JW, Caselmann WH. Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:868–876.
101. McHutchison JG, Patel K, Pockros P, et al. A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006; 44:88–96.
102. Hanecak R, Brown-Driver V, Fox MC, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J Virol* 1996; 70:5203–5212.
103. McCaffrey AP, Meuse L, Karimi M, Contag CH, Kay MA. A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology* 2003; 38:503–508.
104. Mizutani T, Kato N, Hirota M, Sugiyama K, Murakami A, Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus replication by antisense oligonucleotide in culture cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212:906–911.
105. Seki M, Honda Y. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: *in vitro* translation assay. *J Biochem (Tokyo)* 1995; 118:1199–1204.
106. Vidalin O, Major ME, Rayner B, Imbach JL, Trepo C, Inchauspe G. *In vitro* inhibition of hepatitis C virus gene expression by chemically modified antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2337–2344.
107. Wakita T, Wands JR. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. *In vitro* model for selection of target sequence. *J Biol Chem* 1994; 269:14205–14210.
108. Wang S, Wang X, Guan W, Li M. Specific regulatory inhibition of transfected HepG(2) with HCV 5'NCR by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2000; 8:288–290.
109. Wang XH, Wang SQ, Wen SY, Guan W, Mao BZ. [The inhibitory effects of hepatocyte targeting pH-sensitive liposome mediated phosphorothioate antisense oligonucleotide on gene expression controlled by HCV 5'NCR]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2001; 17:626–630.
110. Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:347–353.
111. Basu A, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes. *Virology* 2002; 298:53–62.
112. Meyer K, Basu A, Saito K, Ray RB, Ray R. Inhibition of hepatitis C virus core protein expression in immortalized human hepatocytes induces cytochrome c-independent increase in Apaf-1 and caspase-9 activation for cell death. *Virology* 2005; 336:198–207.
113. Shippy R, Lockner R, Farnsworth M, Hampel A. The hairpin ribozyme. Discovery, mechanism, and development for gene therapy. *Mol Biotechnol* 1999; 12:117–129.

114. Steele D, Kertsburg A, Soukup GA. Engineered catalytic RNA and DNA: new biochemical tools for drug discovery and design. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3:131-144.
115. Usman N, Blatt LM. Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest* 2000; 106:1197-1202.
116. Fedor MJ, Williamson JR. The catalytic diversity of RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:399-412.
117. Bartolome J, Castillo I, Carreno V. Ribozymes as antiviral agents. *Mimerva Med* 2004; 95:11-24.
118. Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:503-514.
119. Guo HZ, Mao Q, Li QF, Wang YM, Yu LC, Jiang YG. Construction of the expression vectors of HDV ribozymes and their intracellular inhibiting activity against HCV RNA. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11:432-435.
120. Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, Wong-Staal F. C-SPACE (cleavage-specific amplification of cDNA ends): a novel method of ribozyme-mediated gene identification. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:E94.
121. Nadal A, Robertson HD, Guardia J, Gomez J. Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting. *J Gen Virol* 2003; 84:1545-1548.
122. Ryu KJ, Lee SW. Identification of the most accessible sites to ribozymes on the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36:538-544.
123. Sabariego R, Nadal A, Beguiristain N, Piron M, Gomez J. Catalytic RNase P RNA from *Synechocystis* sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon. *FEBS Lett* 2004; 577:517-522.
124. Sakamoto N, Wu CH, Wu GY. Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest* 1996; 98:2720-2728.
125. Tian MM, Wang F, Niu JQ, Wang MX. Study on the cleavage activity of U1 small nuclear RNA chimeric ribozyme against HCV RNA *in vitro*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12:749-751.
126. Ludwig J, Blaschke M, Sproat BS. Extending the cleavage rules for the hammerhead ribozyme: mutating adenosine15.1 to inosine15.1 changes the cleavage site specificity from N16.2U16.1H17 to N16.2C16.1H17. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:2279-2285.
127. Welch PJ, Tritz R, Yei S, Leavitt M, Yu M, Barber J. A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: *in vitro* and *in vivo* studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Ther* 1996; 3:994-1001.
128. Lieber A, He CY, Polyak SJ, Gretch DR, Barr D, Kay MA. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol* 1996; 70:8782-8791.
129. Welch PJ, Yei S, Barber JR. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol* 1998; 10:163-171.
130. Sirna Therapeutics [homepage on the Internet]. San Francisco: Sirna Therapeutics, Inc. c2004-2005 [updated 2002 Apr 30; cited 2006 Apr 10]. Press release: Ribozyme pharmaceuticals announces clinical trials update and conference call. Available from: <http://phoenix.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=141787&p=irol-newsArticle&ID=538698&highlight>
131. Sandberg JA, Parker VP, Blanchard KS, et al. Pharmacokinetics and tolerability of an antiangiogenic ribozyme (ANGIOZYME) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000; 40:1462-1469.
132. Kashani-Sabet M. Ribozyme therapeutics. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2002; 7:76-78.
133. Gadkari DA. RNA interference & inhibition of viruses. *Indian J Med Res* 2005; 121:147-150.
134. Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002; 298:2296-2297.
135. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003; 5:834-839.
136. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411:494-498.
137. Strayer DS, Feitelson M, Sun B, Matskevich AA. Paradigms for conditional expression of RNA interference molecules for use against viral targets. *Methods Enzymol* 2005; 392:227-241.
138. Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296:1000-1004.
139. Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3185-3193.
140. Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13:1-7.
141. Hede K. Blocking cancer with RNA interference moved towards the clinic. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:626-628.
142. Check E. A crucial test. *Nat Med* 2005; 11:243-244.
143. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; 418:38-39.
144. Wang Q, Contag CH, Ilves H, Johnston BH, Kaspar RL. Small hairpin RNAs efficiently inhibit hepatitis C IRES-mediated gene expression in human tissue culture cells and a mouse model. *Mol Ther* 2005; 12:562-568.
145. Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, et al. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol* 2004; 48:591-598.
146. Kronke J, Kittler R, Buchholz F, et al. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004; 78:3436-3446.
147. Sen A, Steele R, Ghosh AK, Basu A, Ray R, Ray RB. Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. *Virus Res* 2003; 96:27-35.
148. Randall G, Rice CM. Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 2004; 102:19-25.
149. Radhakrishnan SK, Layden TJ, Gartel AL. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology* 2004; 323:173-181.
150. Prabhu R, Vittal P, Yin Q, et al. Small interfering RNA effectively inhibits protein expression and negative strand RNA synthesis from a full-length hepatitis C virus clone. *J Med Virol* 2005; 76:511-519.
151. Wilson JA, Richardson CD. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* 2005; 79:7050-7058.
152. Lu S, Cullen BR. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol* 2004; 78:12868-12876.
153. Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 2002; 296:1319-1321.
154. Bannasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 2005; 22:607-619.
155. Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002; 418:430-434.



156. Mayer G, Jenne A. Aptamers in research and drug development. *BioDrugs* 2004; 18:351–359.
157. Rimmele M. Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *Chembiochem* 2003; 4:963–971.
158. Sun S. Technology evaluation: SELEX, Gilead Sciences Inc. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2:100–105.
159. Eülberg D, Klusmann S, Spiegelmers: biostable aptamers. *Chembiochem* 2003; 4:979–983.
160. Toulme JJ, Darfeuille F, Kolb G, Chabas S, Staedel C. Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol Cell* 2003; 95:229–238.
161. Zhang Z, Blank M, Schluesener HJ. Nucleic acid aptamers in human viral disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; 52:307–315.
162. Fukuda K, Umehara T, Sekiya S, Kunio K, Hasegawa T, Nishikawa S. An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:670–675.
163. Hwang B, Cho JS, Yeo HJ, et al. Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus. *RNA* 2004; 10:1277–1290.
164. Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, et al. The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:557–562.
165. Kakiuchi N, Fukuda K, Nishikawa F, Nishikawa S, Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus serine protease in living cells by RNA aptamers detected using fluorescent protein substrates. *Comb Chem High Throughput Screen* 2003; 6:155–160.
166. Kumar PK, Machida K, Urvil PT, et al. Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* 1997; 237:270–282.
167. Nishikawa F, Funaji K, Fukuda K, Nishikawa S. In vitro selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. *Oligonucleotides* 2004; 14:114–129.
168. Sekiya S, Nishikawa F, Fukuda K, Nishikawa S. Structure/function analysis of an RNA aptamer for hepatitis C virus NS3 protease. *J Biochem (Tokyo)* 2003; 133:351–359.
169. Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem (Tokyo)* 2005; 137:339–347.
170. Urvil PT, Kakiuchi N, Zhou DM, Shimotohno K, Kumar PK, Nishikawa S. Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem* 1997; 248:130–138.
171. Bellecave P, Andreola ML, Ventura M, Tarrago-Litvak L, Litvak S, Astier-Gin T. Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis *in vitro*. *Oligonucleotides* 2003; 13:455–463.
172. Da Rocha GS, Dausse E, Toulme JJ. Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322:820–826.
173. Aldaz-Carroll L, Tallet B, Dausse E, Yurchenko L, Toulme JJ. Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through *in vitro* selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. *Biochemistry* 2002; 41:5883–5893.
174. Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, et al. Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem* 2000; 267:3685–3694.
175. Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, et al. Analysis of aptamer binding site for HCV-NS3 protease by alanine scanning mutagenesis. *Nucleic Acids Symp Ser* 2000; 44:253–254.
176. Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Kuno A, Hasegawa T, Nishikawa S. A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:683–692.
177. Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, Nishikawa S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:1935–1943.
178. Romero-Lopez C, Barroso-del Jesus A, Puerta-Fernandez E, Berzal-Herranz A. Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel *in vitro* selection method. *Biol Chem* 2005; 386:183–190.
179. Toulme JJ, Darfeuille F, Keolb G, Chabas S, Staedel C. Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol Cell* 2003; 95:229–238.
180. Vo NV, Oh JW, Lai MM. Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology* 2003; 307:301–316.
181. Santoro SW, Joyce GF. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 1998; 37:13330–13342.
182. Geyer CR, Sen D. Use of intrinsic binding energy for catalysis by a cofactor-independent DNA enzyme. *J Mol Biol* 2000; 299:1387–1398.
183. Goila R, Banerjee AC. Sequence specific cleavage of the HIV-1 coreceptor CCR5 gene by a hammer-head ribozyme and a DNA-enzyme: inhibition of the coreceptor function by DNA-enzyme. *FEBS Lett* 1998; 436:233–238.
184. Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA. Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J Biol Chem* 2002; 277:7099–7107.
185. Santiago FS, Khachigian LM. Nucleic acid based strategies as potential therapeutic tools: mechanistic considerations and implications to restenosis. *J Mol Med* 2001; 79:695–706.
186. Khachigian LM. DNazymes: cutting a path to a new class of therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4:119–121.
187. Santiago FS, Lowe HC, Kavurma MM, et al. New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nat Med* 1999; 5:1264–1269.
188. Wu Y, Yu L, McMahon R, Rossi JJ, Forman SJ, Snyder DS. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNazymes). *Hum Gene Ther* 1999; 10:2847–2857.
189. Yen L, Strittmatter SM, Kalb RG. Sequence-specific cleavage of Huntington mRNA by catalytic DNA. *Ann Neurol* 1999; 46:366–373.
190. Chakraborti S, Banerjee AC. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol Ther* 2003; 7:817–826.
191. Goila R, Banerjee AC. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by novel DNA enzymes. *Biochem J* 2001; 353:701–708.
192. Oketani M, Asahina Y, Wu CH, Wu GY. Inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression by a DNA ribonuclease. *J Hepatol* 1999; 31:628–634.
193. Takahashi H, Hamazaki H, Habu Y, et al. A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett* 2004; 560:69–74.
194. Yu YC, Gu CH, Wang SQ, Mao Q, Chen ZB, Liu HL. [Activity of specific deoxyribozymes to cleave hepatitis C virus RNA *in vitro*]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11:156–158.
195. Trepanier J, Tanner JE, Le ONL, Alvarez F, Alfieri C. Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes. *J Viral Hepat* 2006; 13:131–138.
196. Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 34:3–19.

197. Richardson P, Kren BT, Steer CJ. *In vivo* application of non-viral vectors to the liver. *J Drug Target* 2002; 10:123-131.
198. Juliano RL, Alahari S, Yoo H, Kole R, Cho M. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharmacol Res* 1999; 16:494-502.
199. Luo D, Woodrow-Mumford K, Belcheva N, Saltzman WM. Controlled DNA delivery systems. *Pharmacol Res* 1999; 16:1300-1308.
200. Dass CR. Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy *in-vivo*. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:593-601.
201. Takano S, Aramaki Y, Tsuchiya S. Physicochemical properties of liposomes affecting apoptosis induced by cationic liposomes in macrophages. *Pharmacol Res* 2003; 20:962-968.
202. Uchida E, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:891-897.
203. Wattiaux R, Jadot M, Laurent N, Dubois F, Wattiaux-De Coninck S. Cationic lipids delay the transfer of plasmid DNA to lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227:448-454.
204. Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL. Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* 2000; 52:325-347.
205. Juliano RL, Yoo H. Aspects of the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2:297-303.
206. Bennett CF. Antisense oligonucleotides: is the glass half full or half empty? *Biochem Pharmacol* 1998; 55:9-19.
207. Hughes JA, Aronsohn AI, Avrutskaya AV, Juliano RL. Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides. *Pharmacol Res* 1996; 13:404-410.
208. Mahato RI, Takakura Y, Hashida M. Development of targeted delivery systems for nucleic acid drugs. *J Drug Target* 1997; 4:337-357.
209. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:5177-5181.
210. Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 27:17-28.
211. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 2001; 22:471-480.
212. Hjortkjaer RK, Bechgaard E, Gizurarson S, Suzdak C, McDonald P, Greenough RJ. Single- and repeated-dose local toxicity in the nasal cavity of rabbits after intranasal administration of different glycols for formulations containing benzodiazepines. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51:377-383.
213. Montaguti P, Melloni E, Cavalletti E. Acute intravenous toxicity of dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol 400, dimethylformamide, absolute ethanol, and benzyl alcohol in inbred mouse strains. *Arzneimittelforschung* 1994; 44:566-570.
214. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003; 24:1121-1131.
215. Foreman JC, Lichtenstein LM. Induction of histamine secretion by polycations. *Biochim et Biophys Acta* 1980; 629:587-603.
216. Jon S, Anderson DG, Langer R. Degradable poly(amino alcohol esters) as potential DNA vectors with low cytotoxicity. *Biomacromolecules* 2003; 4:1759-1762.
217. Lanford RE, Bigger C. Advances in model systems for hepatitis C virus research. *Virology* 2002; 293:1-9.
218. Guha C, Shah SJ, Ghosh SS, Lee SW, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Molecular therapies for viral hepatitis. *BioDrugs* 2003; 17:81-91.
219. Beames B, Chavez D, Guerra B, Notvall L, Brasky KM, Lanford RE. Development of a primary tamarin hepatocyte culture system for GB virus-B: a surrogate model for hepatitis C virus. *J Virol* 2000; 74:11764-11772.
220. Beames B, Chavez D, Lanford RE. GB virus B as a model for hepatitis C virus. *ILAR J* 2001; 42:152-160.
221. Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, *et al.* Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 1998; 244:513-520.
222. Davis PH, Stanley SL Jr. Breaking the species barrier: use of SCID mouse-human chimeras for the study of human infectious diseases. *Cell Microbiol* 2003; 7:849-860.
223. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7:927-933.

---

Accepted for publication 14 February 2006

---