

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
**INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
—  
COURBEVOIE  
—

①1 N° de publication : **2 973 380**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **11 52786**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 07 K 14/46** (2017.01), A 61 K 38/10, 38/04, 38/17,  
A 61 P 35/00, C 12 N 15/63, 15/12

⑫

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤4 PEPTIDES ISOLES ET PURIFIES A PARTIR DE TESTICULES DE ROUSSETTE.

②2 Date de dépôt : 01.04.11.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 05.10.12 Bulletin 12/40.

④5 Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 09.02.18 Bulletin 18/06.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *KELIA* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : AUVRAY PIERRICK, DUVAL ELISE,  
BARON AMANDINE, CHAUVIN CECILE, HESRY  
VINCENT, JOUQUAN DEBORAH, MARTIN  
MELANIE, REDON EMMA, SOURDAINE PASCAL,  
BOURGEON FREDERIC, MELAINE NATHALIE,  
PINEAU CHARLES et ROUILLON ASTRID.

⑦3 Titulaire(s) : *KELIA*.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LE GUEN ET MAILLET  
Société civile professionnelle.

**FR 2 973 380 - B1**



La présente invention concerne des peptides bioactifs isolés et purifiés à partir de testicules de roussettes, leur utilisation en tant que médicament, en particulier leur application dans le domaine de la prévention et du traitement du cancer.

Près de huit millions de personnes meurent chaque année des suites de cancer dans le monde. Chez l'homme, les trois cancers les plus fréquemment observés sont ceux de la prostate, du poumon et du colon-rectum. Chez la femme, il s'agit des cancers du sein, du colon rectum et du poumon.

Le traitement du cancer repose aujourd'hui principalement sur quatre axes, souvent combinés entre eux : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie.

L'intervention chirurgicale a pour objectif de retirer la tumeur mais est le plus souvent suivie d'autres traitements tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie.

La radiothérapie permet de détruire les cellules cancéreuses en utilisant de hautes doses de rayons-X capables de provoquer des lésions suffisamment importantes de l'ADN des cellules pour que celles-ci ne puissent pas les réparer.

L'hormonothérapie consiste à empêcher l'action ou la synthèse des hormones impliquées dans la croissance de certains cancers hormono-dépendants, comme celui du sein et de la prostate.

La chimiothérapie a, elle, pour objectif d'enrayer ou de ralentir la prolifération anarchique des cellules cancéreuses au sein de l'organisme. Il existe plusieurs classes de substances anticancéreuses utilisées en chimiothérapie: les antimétabolites qui bloquent la synthèse de l'ADN, les agents alkylants, les agents intercalants qui se fixent entre les deux brins de l'ADN et interagissent avec la topoisomérase II, enzyme nécessaire à la fabrication normale de molécules d'ADN et les substances qui cassent la molécule d'ADN.

Malheureusement, on observe chez les patients de nombreux effets secondaires à la chimiothérapie. En effet, la majorité des produits anticancéreux utilisés sont toxiques pour les cellules sanguines. Elles entraînent pour certaines une baisse du nombre de ces cellules et l'apparition d'infections et d'hémorragies. La peau et les muqueuses sont également susceptibles d'être touchées provoquant alors des réactions érythémateuses, des ulcérations de la bouche ou des lésions des muqueuses. Certaines substances sont encore extrêmement toxiques pour le tube digestif et pour les reins. En outre, les chutes de cheveux et les troubles du rythme cardiaque sont très fréquents chez les patients traités.

Compte tenu du rapport efficacité/toxicité relativement modeste, ainsi que des effets secondaires engendrés par les traitements usuels, notamment par la chimiothérapie, on recherche aujourd'hui de nouvelles stratégies anticancéreuses et notamment des thérapies basées sur l'utilisation de produits d'origines naturelles.

5 Par exemple, des molécules présentant des propriétés antiangiogéniques et/ou antitumorales ont été identifiées chez le requin (Cho et Kim, 2002). Ces poissons sélaciens appartiennent à la classe des Chondrichthyens et à la sous-classe des Elasmobranches. Bien que généralement considérés comme des espèces ne développant pas de cancer, quelques cas de cancers bénins ou malins ont été  
10 néanmoins décrits dans la littérature (Ostrander et al., 2004). Une étude réalisée dans les années soixante-dix a montré que le sérum de requin présentait une activité inhibitrice concernant le carcinome pulmonaire de Lewis. Par la suite, il a été mis en évidence d'importantes activités anti-angiogéniques dans des extraits de cartilage de requin (Cho and Kim, 2002). A partir de celui-ci, plusieurs inhibiteurs de  
15 l'angiogenèse ont été identifiés.

La mise en évidence de différentes activités anti-angiogéniques a conduit à la mise en place d'études cliniques de stades I/II à partir d'extraits de cartilage de requin en combinaison ou non avec d'autres agents anti-cancéreux. Utilisés seuls, les extraits de cartilage ne permettent pas d'obtenir un effet significatif chez les patients atteints  
20 de cancers avancés (Loprinzi et al., 2005) sauf pour les doses les plus élevées qui permettent une meilleure survie de patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules (Latreille et al., 2003). Cependant, les extraits de cartilage se sont avérés peu efficaces lors des essais de phase III pour des cancers avancés du rein (Escudier et al., 2004) ou du poumon non à petites cellules (Lu et al., 2007 et 2010).

25 On sait, de plus, que l'huile de foie de requin est une huile riche en composés tels que le squalène, la squalamine ou les alkylglycérols. Ces composés sont des composés d'intérêts connus pour leurs propriétés antiangiogéniques et/ou antitumorales ainsi que pour leur effet bénéfique en traitement combiné avec le cisplatine (Das et al., 2003 ; Herbst et al., 2003).

30 Enfin, le tissu épigonal de la roussette (*Squalus acanthias*) semble aussi contenir un composé nommé EGIF (Epigonal Growth-Inhibitory Factor) capable d'inhiber la prolifération des cellules germinales pré-méiotiques (Pieffer et al., 1995). Carl Luer et al. ont montré que du milieu conditionné de tissu épigonal présentait une activité anti-tumorale (données non publiées).

Ainsi, il ressort de l'ensemble de ces données que les requins appartiennent à une espèce intéressante pour la caractérisation de nouvelles molécules. Au sein de cette espèce, se trouve un poisson communément nommé roussette.

La roussette présente des testicules de taille importante (12 à 15 cm, 8 à 13 g) 5  
lesquelles présentent une organisation anatomique particulière. En effet, comme chez les autres sélaciens, les testicules de roussette sont constitués de spermatocystes (cystes) clos dans lesquels la spermatogenèse est synchrone. Ces cystes sont constitués de spermatoblastes arrangés autour d'une cavité centrale. Chaque spermatoblaste est constitué d'une cellule somatique, ou cellule cystique ou de Sertoli, 10  
associée à un clone de cellules germinales. Au cours de la spermatogenèse, la succession des cystes de la zone germinative, lieu de leur formation, vers la zone de spermiation, entraîne une zonation du testicule en quatre zones : la zone germinative des cystes à spermatogonies (zone A), la zone à spermatocytes (zone B), la zone à spermatides rondes (zone C) et la zone à spermatides allongées (zone D) (Sourdaine et al., 1989 ; Loir et al., 1995). Le choix du modèle testiculaire de roussette repose donc 15  
à la fois sur l'étude de la spermatogenèse en tant que processus biologique de prolifération, de différenciation cellulaire, d'apoptose et sur les particularités de l'organisation anatomique du testicule qui permet une séparation aisée et en quantités importantes des tissus correspondant aux différentes étapes de la spermatogenèse 20  
(Loir et al., 1995).

C'est à partir de ces différentes observations que la société demanderesse a entrepris de rechercher et de caractériser de nouvelles molécules utiles dans le domaine de la santé et a ainsi pu isoler et purifier de nouveaux peptides actifs présentant, en particulier, une activité anti-tumorale importante.

25 La présente invention a ainsi pour objet un ou plusieurs nouveaux peptides, isolés et purifiés à partir du tractus génital de roussette, pour leur utilisation en tant que médicament, en particulier, pour leur utilisation dans la prévention et/ou le traitement de cancers.

Les peptides selon l'invention ont été obtenus à partir de la sphère génitale de 30  
roussette préalablement disséquée et séparée en fonction des zones testiculaires telles que décrites précédemment. Les protéines ont été extraites des échantillons prélevés puis ont été purifiées, fractionnées et sélectionnées en fonction de leur taille. Les peptides isolés et purifiés ont alors été évalués pour leurs propriétés fonctionnelles et ont été séquencés.

En particulier, l'invention concerne des peptides isolés et purifiés à partir du tractus génital de roussette pour leur utilisation dans la prévention et/ou le traitement du cancer du colon, du cancer du sein, préférentiellement du cancer du sein hormono-dépendant, de la leucémie aigue promyélocytaire, du cancer de l'ovaire, du mélanome, du cancer du poumon à petites cellules.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les peptides présentent une taille inférieure à 100 acides aminés, préférentiellement inférieure ou égale à 20 acides aminés et/ou présentent une masse moléculaire inférieure ou égale à 10 KDa.

Les extraits peptidiques issus des échantillons prélevés des testicules de roussette sont fractionnés à l'aide, par exemple, de microconcentrateurs dont le seuil de coupure est de 10 KDa.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les peptides selon l'invention comprennent, sont constitués de, ou sont dérivés de, une séquence en acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4.

Selon un mode particulier de réalisation, l'invention concerne un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de la séquence en acides aminés SEQ ID NO :1 pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement du carcinome mammaire humain hormono-dépendant ou de la leucémie aigüe promyélocytaire, préférentiellement du carcinome mammaire humain hormono-dépendant.

Selon un autre mode particulier de réalisation, l'invention concerne un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, la séquence en acides aminés SEQ ID NO :2 pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de l'adénocarcinome humain de l'ovaire, le mélanome humain ou le carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement de l'adénocarcinome humain de l'ovaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation, l'invention concerne un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, la séquence en acides aminés SEQ ID NO :3 pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement du mélanome humain, du carcinome pulmonaire humain à petites cellules ou de la leucémie aigüe promyélocytaire, préférentiellement du mélanome humain.

Selon un autre mode particulier de réalisation, l'invention concerne un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, la séquence en acides aminés SEQ ID NO : 4 pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de l'adénocarcinome humain

du colon, de la leucémie aiguë promyélocytaire ou du carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement, de l'adénocarcinome humain du colon.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la roussette appartient à l'espèce *Scyliorhinus canicula*.

5 L'invention concerne aussi un vecteur de délivrance comprenant au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications précédentes.

Au sens de l'invention, on entend par « vecteur de délivrance » tout vecteur apte à véhiculer ou transporter un peptide selon l'invention à l'intérieur du corps humain ou animal.

10 A titre d'exemple, des vecteurs particulièrement adaptés pour la délivrance de peptides selon l'invention sont des archaéosomes tels que ceux décrits dans la demande de brevet PCT/EP2005/05655. Ces vecteurs de délivrance sont des liposomes et sont généralement constitués de lipides bipolaires de type tétraéther isolés à partir d'archaebactéries méthanogènes ou thermoacidophiles ou d'analogues  
15 synthétiques. Tout autre vecteur de délivrance connu de l'homme du métier est bien entendu envisagé. A ce titre, il importe que ledit vecteur de délivrance puisse franchir les barrières biologiques en fonction de son mode d'administration.

L'invention concerne encore une composition pharmaceutique comprenant au moins un peptide isolé et purifié à partir du tractus génital de roussette,  
20 avantageusement associé à un véhicule, un adjuvant et/ou un diluant acceptable sur le plan pharmaceutique.

Par « véhicule » au sens de l'invention, on entend toute substance présente au sein de la composition contenant un peptide de l'invention et prévue pour faciliter son transport, assurer sa protection de toute dégradation dans la composition et préserver  
25 ses propriétés. Un véhicule pharmaceutiquement acceptable sera choisi en fonction de la voie d'administration de la composition contenant le ou les peptides selon l'invention.

En particulier, l'invention concerne une telle composition pharmaceutique pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement du cancer, préférentiellement du  
30 cancer du colon, du cancer du sein hormono-dépendant, de la leucémie aiguë promyélocytaire, du cancer de l'ovaire, du cancer du colon, du mélanome, du cancer du poumon à petites cellules.

Selon un mode particulier de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique qui comprend au moins un peptide comprenant, dérivé de, ou

constitué de, la séquence SEQ ID NO : 1 pour le traitement et/ou la prévention du carcinome mammaire humain hormonaux dépendant ou de la leucémie aiguë promyélocytaire, préférentiellement du carcinome mammaire humain hormono-dépendant.

5 Selon un autre mode particulier de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique qui comprend au moins un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, la séquence SEQ ID NO : 2 pour le traitement et/ou la prévention de l'adénocarcinome humain de l'ovaire, le mélanome humain ou le carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement de l'adénocarcinome humain  
10 de l'ovaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique qui comprend au moins un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, la séquence SEQ ID NO : 3 pour le traitement et/ou la prévention du mélanome humain, du carcinome pulmonaire humain à petites cellules ou de la  
15 leucémie aiguë promyélocytaire, préférentiellement du mélanome humain.

Selon un autre mode particulier de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique qui comprend au moins un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, la séquence SEQ ID NO : 4 pour le traitement et/ou la prévention de l'adénocarcinome humain du colon, de la leucémie aiguë promyélocytaire ou du  
20 carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement, de l'adénocarcinome humain du colon.

Les compositions selon l'invention se présenteront par exemple sous une forme solide, telle qu'un comprimé, une gélule ou une poudre, une forme liquide, telle qu'une solution, une suspension, une émulsion, un sirop, ou sous forme de crème ou  
25 de gel, en fonction du mode d'administration envisagé.

Dans la composition selon l'invention, ledit peptide peut se présenter sous la forme d'un sel.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut, en outre, contenir un ou plusieurs principes actifs additionnels.

30 L'invention concerne encore l'utilisation d'un peptide tel que défini précédemment pour la préparation d'un médicament.

L'invention concerne encore une méthode de traitement du cancer, préférentiellement du cancer du colon, du cancer du sein hormono-dépendant, de la leucémie aiguë promyélocytaire, du cancer de l'ovaire, du cancer du colon, du

mélanome, du cancer du poumon à petites cellules, dans laquelle un peptide isolé et purifié à partir de testicules de roussette ou dérivé de testicules de roussette est administré à un patient.

L'invention concerne également un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, une séquence en acides aminés choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 4, en tant que tel.

Le Tableau 1 ci dessous indique les séquences peptidiques SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 selon l'invention :

10 Tableau 1

<b>Séquence</b>	<b>Code à 1 lettre</b>
SEQ ID NO : 1	N F D T D E Q A L E D V F S K Y G
	<b>Code à 3 lettres</b>
SEQ ID NO : 1	Asn Phe Asp Thr Asp Glu Gln Ala Leu Glu Asp Val Phe Ser Lys Tyr Gly
<b>dénomination</b>	<b>K092A</b>
<b>Séquence</b>	<b>Code à 1 lettre</b>
SEQ ID NO : 2	E A P P E A A E E D E W
<b>Séquence</b>	<b>Code à 3 lettres</b>
SEQ ID NO : 2	Glu Ala Pro Pro Glu Ala Ala Glu Glu Asp Glu Trp
<b>dénomination</b>	<b>K092B</b>
<b>Séquence</b>	<b>Code à 1 lettre</b>
SEQ ID NO : 3	C N R R R V
<b>Séquence</b>	<b>Code à 3 lettres</b>
SEQ ID NO : 3	Cys Asn Arg Arg Arg Val
<b>dénomination</b>	<b>K092C</b>
<b>Séquence</b>	<b>Code à 1 lettre</b>
SEQ ID NO : 4	Q L T P E A L A D E E E M N A L A A R
<b>Séquence</b>	<b>Code à 3 lettres</b>
SEQ ID NO : 4	Gln Leu Thr Pro Glu Ala Leu Ala Asp Glu Glu Glu Met Asn Ala Leu

	Ala Ala Arg
<b>Dénomination</b>	<b>K092D</b>

Au sens de l'invention, un peptide comprenant, dérivé de, ou constitué de, une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 4 peut être un peptide naturel ou synthétique.

5 On entend par peptide « dérivé », un peptide présentant entre 70 et 99%, préférentiellement entre 75 et 95%, plus préférentiellement entre 85 et 95% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 1 à 4, c'est à dire des peptides ayant subi au moins une addition et/ou au moins une substitution et/ou au moins une délétion d'un acide aminé.

10 Les « dérivés » au sens de l'invention incluent également les peptides présentant une modification post-traductionnelle et/ou une modification chimique telle qu'une glycosylation, une amidation, une acylation, une acétylation, une méthylation ou les peptides comprenant un groupement protecteur prévu pour empêcher toute dégradation dudit peptide.

15 Parmi les dérivés des peptides de l'invention sont encore inclus ceux dont un ou plusieurs acides aminés sont des acides aminés naturels de conformation D, des énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés rares tels que l'hydroxyproline, l'hydroxylysine, l'allohydroxylysine, la 6-N méthyllysine, la N-éthylglycine, la Nméthylglycine, la N-éthylasparagine, l'alloisoleucine, la N-  
20 méthylisoleucine, la N-méthylvaline, la pyroglutamine, l'acide aminobutyrique et les acides aminés synthétiques notamment l'ornithine, la norleucine, la norvaline, la cyclohexyl-alanine et les oméga-acides aminés.

L'invention concerne aussi un acide nucléique comprenant une séquence nucléique codant pour un peptide selon l'invention, en particulier pour un peptide  
25 comprenant, dérivé de, ou constitué d'une séquence en acides aminés choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 4. L'invention concerne également une séquence nucléique complémentaire d'une telle séquence nucléique codante.

30 On entend par « acide nucléique » selon la présente invention, une séquence nucléique d'ADN ou d'ARN. La séquence d'un tel acide nucléique peut être déduite à l'aide du code génétique par un homme du métier à partir de la séquence en acides aminés d'un peptide selon l'invention. Un tel acide nucléique peut ensuite être isolé

par criblage de banques d'acides nucléiques en utilisant un ou plusieurs oligonucléotides de la séquence déduite.

L'invention concerne aussi une cassette d'expression comprenant au moins une séquence d'un tel acide nucléique ainsi qu'un vecteur d'expression et/ou de clonage  
5 comprenant au moins une séquence d'un tel acide nucléique ou une telle cassette d'expression.

Préférentiellement, une cassette d'expression, ou un vecteur de clonage et/ou d'expression comprend un promoteur approprié, c'est à dire un promoteur constitutif ou inductible, ainsi qu'un terminateur.

10 Un vecteur de clonage et/ou d'expression selon l'invention peut être un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus et comporte avantageusement des éléments permettant son maintien, sa réplication et/ou sa sélection dans un organisme hôte. De tels vecteurs sont bien connus de l'homme du métier.

La présente invention est maintenant décrite plus en détail en lien avec les  
15 exemples de modes de réalisation qui suivent ainsi que les figures parmi lesquelles :

Les Figs. 1 à 6 illustrent les effets anti-prolifératifs d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 4, en comparaison avec un contrôle, sur les lignées  
cancéreuses humaines HT-29 (Figs. 1 et 2), NCI H69 (Figs. 3 et 4) et CCRF CEM  
(Figs. 5 et 6), en fonction du log de la concentration dudit peptide exprimé en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .  
20 Les résultats sont exprimés en IC50 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou en IC75 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Les Figs. 7 à 12 illustrent les effets anti-prolifératifs d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 1, en comparaison avec un contrôle, sur les lignées  
cancéreuses humaines MCF-7 (Figs. 7 et 8) , ZR-75-1 (Figs. 9 et 10) et CCRF CEM  
(Figs. 11 et 12), en fonction du log de la concentration dudit peptide exprimé en  
25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Les résultats sont exprimés en IC50 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Les Figs. 13 à 18 illustrent les effets anti-prolifératifs d'un peptide contenant la SEQ ID NO : 2, en comparaison avec un contrôle, sur les lignées cancéreuses  
humaines NCI H69 (Figs. 13 et 14), SK-OV-3 (Figs. 15 et 16) et A375 (Figs. 17 et 18),  
en fonction du log de la concentration dudit peptide exprimé en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Les résultats  
30 sont exprimés en IC50 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Les Figs. 19 à 24 illustrent les effets anti-prolifératifs d'un peptide contenant la SEQ ID NO : 3, en comparaison avec un contrôle, sur les lignées cancéreuses  
humaines A375 (Figs. 19 et 20), NCI H69 (Figs. 21 et 22) et CCRF CEM (Figs. 23 et

24), en fonction du log de la concentration dudit peptide exprimé en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Les résultats sont exprimés en IC50 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Dans les Figs. 1 à 24, les effets antiprolifératifs des contrôles positifs correspondants à chaque lignée cellulaire sont également représentés en fonction du log de la concentration dudit contrôle exprimé en molaire (M). Les résultats sont exprimés en IC50 (M).

La Fig. 25 est un graphique représentant le volume tumoral moyen entre T0 et T22 mesuré lors d'un test *in vivo* d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 4.

La Fig. 26 est un graphique représentant les valeurs des ratios T/C% (médiane volume tumoral groupe traité/médiane volume tumoral groupe contrôle négatif) entre T0 et T22 relevées lors d'un test *in vivo* d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 4.

La Fig. 27 est un graphique représentant le volume tumoral moyen entre T0 et T10 mesuré lors d'un test *in vivo* d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 3.

La Fig. 28 est un graphique représentant les valeurs des ratios T/C% (médiane volume tumoral groupe traité/médiane volume tumoral groupe contrôle négatif) entre T0 et T10 relevées lors d'un test *in vivo* d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 3.

La Fig. 29 est un graphique représentant le volume tumoral moyen entre T0 et T11 mesuré lors d'un test *in vivo* d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 2.

La Fig. 30 est un graphique représentant les valeurs des ratios T/C% (médiane volume tumoral groupe traité/médiane volume tumoral groupe contrôle négatif) entre T0 et T11 relevées lors d'un test *in vivo* d'un peptide constitué de la séquence SEQ ID NO : 2.

## 1) PREPARATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES ET DES PEPTIDES

### 5 a) Collecte des échantillons biologiques

Des roussettes adultes appartenant à l'espèce *Scyliorhinus canicula* ont été pêchées puis maintenues en eau de mer naturelle. Les roussettes sont démédules et décérébrées puis les testicules sont rapidement prélevés et coupés en sections transversales de 2 mm. Les différentes zones testiculaires A, B, C et D, telles que  
10 définies précédemment, ainsi que le tissu épigonal lymphopoïétique qui borde l'une des faces du testicule sont disséqués. Les prélèvements issus d'au moins 6 roussettes sont regroupés en un seul échantillon afin d'éviter les variations individuelles.

Ces tissus, coupés en morceaux, sont broyés et homogénéisés dans du tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7,5 ; 1 mM EDTA ; 0,5 mM DTT) et un mélange  
15 d'inhibiteurs de protéases. Cinq sonications de 10 secondes sont effectuées puis le lysat est purifié par ultracentrifugation (15000g, 30 min. à 4°C puis 105000g, 1h à 4°C).

### b) Séparation des peptides en fonction de leur taille

Après ultracentrifugation, les extraits biologiques ont été fractionnés par  
20 filtration sur membrane Amicon Ultra 4 (30.000 NMWL, Millipore) dont le seuil de coupure est de 10 Kda, afin d'éliminer les protéines de taille supérieure à 10 kDa.

### c) Fractionnement HPLC en phase inverse

Les échantillons peptidiques de taille inférieure à 10 KDa ont été fractionnés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) sur un  
25 système Breeze™ (Société Waters) à l'aide d'une colonne de phase inverse C18 Vydac (218TP54).

### d) Criblage de l'activité anti-cancéreuse dans les fractions purifiées par RP-HPLC

Les différentes fractions obtenues par RP-HPLC ont ensuite été testées par des  
30 tests de cytotoxicité afin de déterminer leur activité anticancéreuse potentielle sur des lignées cellulaires listées dans le Tableau 2 (voir exemple 1).

### e) Identification des peptides actifs dans les fractions actives par spectrométrie de masse.

Les extraits peptidiques ayant montré des activités intéressantes ont été analysés par spectrométrie de masse de type trappe d'ions (Esquire HCT Ultra®, Bruker Daltonics) couplée à une chromatographie liquide nanodébit (nanoLC Ultimate 3000®, Dionex). L'ensemble des données brutes obtenues après analyse des spectres de masse (fragmentation MS/MS) est interprété par analyse de novo (PEAKS® Studio, BSI : Module "Protein identification", présentant l'avantage de pouvoir travailler en mode peptide natif (pas d'enzyme) et permettant l'exploitation des listes de masse issues des fragmentations MS/MS ; Module "Spider", permettant une recherche sur un mode blast-like ; Module "Inchorus", permettant un regroupement des résultats Protein identification et Spider). Un filtre est appliqué tenant compte des scores de confiance obtenus sur les séquences de novo proposées. Plusieurs peptides ont été identifiés dont les peptides de séquence SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et SEQ ID NO :4 et les séquences correspondantes ont ensuite servi d'amorces pour le criblage par PCR des banques d'ADN complémentaires.

#### 15 **f) Construction des banques géniques**

Trois banques d'ADN complémentaires (ADNc) ont été construites à l'aide d'un kit prévu à cet effet (Stratagene pBluescript II XR cDNA library construction kit) à partir de 5 µg d'ARNm extraits des différentes zones testiculaires. Pour chaque banque, 5 µg d'ARNm ont été rétrotranscrits en ADNc double brin marqué au [α<sup>32</sup>P]GTP. Des adaptateurs EcoRI et XhoI ont ensuite été liés aux extrémités des ADNc. Ces ADNc ont été fractionnés selon leur taille sur résine de sépharose puis clonés dans les sites EcoRI et XhoI du plasmide pBluescript II SK (+).

#### 20 **g) Recherche de séquences par criblage oligonucléotidique des banques d'ADNc**

25 A partir des séquences peptidiques obtenues par les analyses en spectrométrie de masse, les séquences nucléotidiques ont été dessinées. Ainsi, à l'aide du programme Codehop, on dessine des amorces présentant une partie 5' non dégénérée (dont la séquence nucléotidique est fixée en accord avec l'usage de codons de *Squalus acanthias*) et une partie 3' dégénérée. Ces séquences dégénérées ont été définies afin de cribler les banques géniques. Les criblages ont été réalisés pour chaque tag par PCR sur les banques d'ADNc avec la (les) amorce(s) dégénérée(s) correspondant au tag peptidique et une amorce définie sur le vecteur pBluescript II SK (+) de clonage de la banque. Après clonage et séquençage de la séquence isolée par le criblage

primaire, une PCR de confirmation est réalisée pour obtenir la séquence exacte du clone cible.

## PRODUCTIONS DES PEPTIDES

5

Les peptides de l'invention peuvent être obtenus par extraction à partir de testicules de roussette ou encore synthétisés par n'importe quelle méthode connue de l'homme du métier. Les peptides de l'invention peuvent ainsi être obtenus par synthèse chimique. Un peptide recombinant peut également être produit par un procédé dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique codant pour un peptide d'intérêt est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du peptide correspondant. Le peptide produit peut ensuite être récupéré et purifié grâce aux procédés de purifications connus par l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques des ARN messagers susceptibles de coder pour chaque peptide SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 4 peuvent être déduites des séquences peptidiques par un homme du métier qui connaît les codons codant pour chaque acide aminé. Un codon stop est ajouté en fin de séquence d'ARNm.

**Exemple 1: Caractérisation de l'efficacité anti-proliférative des peptides SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4**

L'efficacité anti-tumorale des peptides SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 a été évaluée sur un panel de différentes lignées cellulaires représentatives des principaux cancers rencontrés chez l'homme dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

LIGNEES CELLULAIRES	ORIGINE	REFERENCE
A375	Mélanome humain	(Giard et al., 1973)
CCRF CEM <sup>(b)</sup>	Leucémie aiguë promyélocytaire	(Foley et al., 1965)
NCI H69 <sup>(a)</sup>	Carcinome pulmonaire humain à petites cellules	(Carney et al., 1985)
HT-29 <sup>(a)</sup>	Adénocarcinome humain de colon de grade II	(Zupi et al., 1988)
SK-OV-3	Adénocarcinome humain de l'ovaire	(Fogh et al., 1977)

ZR-75-1 <sup>(a)</sup>	Carcinome mammaire humain hormono-dépendant	(Engel et al., 1978)
MCF-7	Carcinome mammaire humain hormono-dépendant	(Sugarman et al., 1985)

(a): ECACC, Sigma, France; (b): ATCC, LGC Promochem, France.

La culture de ces lignées cellulaires est effectuée dans un milieu approprié décrit dans le Tableau 3 ci-dessous.

5 Tableau 3

LIGNEES CELLULAIRES	MILIEU DE CULTURE	CONDITIONS DE CULTURE
A375	DMEM (Réf. BE12-602F/U1, Lonza, France) + 2mM L-glutamine (BE17-605E, Lonza) + 15% SVF (DE14-801F, Lonza)	37°C, 5% CO2
CCRF CEM	RPMI 1640 (Réf. BE17-702F, Lonza) + 10% SVF (DE14-801F, Lonza) + HEPES 10 mM (Réf. BE17-737E, Lonza) + Glucose 4,5 g/L (Réf. G7528, Sigma, France) + NaHCO3 1,5 g/L (Réf. S5761, Sigma) + Sodium Pyruvate 1 mM (Réf. DE14-801F, Lonza)	37°C, 5% CO2
NCI H69	RPMI 1640 + 10% SVF + 2 mM Glutamine	37°C, 5% CO2
HT-29	McCOY's 5A (Réf. BE12-688F, Lonza) + 10% SVF	37°C, 5% CO2
SK-OV-3	Mc Coy's 5A + 15% SVF + 2mM L-glutamine	37°C, 5% CO2
ZR-75.1	RPMI 1640 + 10% SVF + 2 mM L-Glutamine + 1 mM Pyruvate de sodium + beta-oestradiol 10 nM (Réf. E2758, Sigma)	37°C, 5% CO2
MCF-7	EMEM + sodium pyruvate 1 mM + NEAA 0,1 mM + NaHCO3 1,5 g/L + 10 % SVF + Glutamine 2 mM + beta-estradiol 10 nM	37°C, 5% CO2

Les cellules sont amplifiées, collectées, comptées et leur viabilité est évaluée par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan. La présence de mycoplasmes est évaluée

grâce au kit de détection par PCR des mycoplasmes (Réf. 6601, Takara, France). Les cellules sont ensuiteensemencées en plaque 96 puits à raison de 500 à 15000 cellules/puits comme indiqué dans le Tableau 4 ci-dessous. Elles sont incubées à 37°C sous une atmosphère à 5% CO<sub>2</sub> pendant 24h.

5

Tableau 4

Lignées cellulaires	Nombre de cellules à implanter	Contrôle positif
A375	500	CDDP
CCRF CEM	5000	Doxorubicine
HT-29	2500	CDDP
MCF-7	5000	Tamoxifen
NCI H69	15000	CDDP
SK-OV-3	850	Paclitaxel
ZR-75.1	1000	Paclitaxel

Les lignées sont implantées dans le but de tester différentes concentrations en peptides comprises entre 0,005 µg/µl et 2,5 µg/µl à raison de trois puits par concentration.

10

Pour ce faire, 24h après incubation, les cellules sont de nouveau incubées à 37°C pendant 96h en présence des peptides à des concentrations comprises entre 0,005 µg/µl et 2,5 µg/µl ou en présence d'un contrôle positif (voir Tableau 4). A la fin du traitement, les cellules sont incubées à 37°C pendant 2 à 4 h (selon les lignées cellulaires) avec 10 µl de solution WST-1 (sels de tétrazolium ; Réf. 1644807, Roche, France) afin d'évaluer la viabilité cellulaire (formation de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale). La lecture de l'absorbance à 450 nm et l'analyse par rapport aux contrôles permet de déterminer l'efficacité anticancéreuse des peptides sur ces modèles cellulaires *in vitro*. Ainsi après cette incubation, les plaques de 96 puits sont agitées 10 sec avec l'appareil Multiskan® EX (Thermo Labsystems, France). L'absorbance est ensuite mesurée par rapport à un contrôle blanc en utilisant le lecteur de microplaques Multiskan® EX à 450 nm, la longueur d'onde de référence étant 620 nm. Les résultats sont présentés sur les Figs. 1, 2, 3 et 4 concernant les peptides comprenant les séquences SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3, respectivement.

25

Les IC 50 et IC 75, indiquant la quantité de peptides nécessaire pour inhiber 50 %, respectivement 25%, de la multiplication cellulaire, pour les lignées cellulaires sont indiquées ci-dessous :

- SEQ ID NO : 1 : IC50 à 1,09 µg/µl (0,55 mM) sur MCF7 (Carcinome mammaire humain hormono-dépendant) (Figs. 7 et 8), IC50 à 1,22 µg/µl (0,62 mM) sur ZR-75-1 (Carcinome mammaire humain hormono-dépendant) (Figs. 9 et 10), et IC50 à 0,96 µg/µl (0,49 mM) sur CCRF CEM (Leucémie aiguë promyélocytaire) (Figs. 11 et 12) ;

- SEQ ID NO : 2 : IC50 à 1,16 µg/µl (0,85 mM) sur SK-OV3 (Adénocarcinome humain de l'ovaire) (Figs. 15 et 16), IC50 à 1,25 µg/µl (0,91 mM) sur A375 (Mélanome humain) (Figs. 17 et 18), et IC50 à 1,13 µg/µl (0,82 mM) sur NCI H69 (Carcinome pulmonaire humain à petites cellules) (Figs. 13 et 14) ;

- SEQ ID NO : 3 : IC50 à 1,8 µg/µl (2,2 mM) sur A375 (Figs. 19 et 20), IC50 à 1,8 µg/µl (2,2 mM) sur NCI H69 (Figs. 21 et 22) et IC50 à 1,53 µg/µl (1,9 mM) sur CCRF CEM (Figs. 23 et 24) ;

- SEQ ID NO : 4: IC50 à 1,79 µg/µl (0,86 mM) sur HT-29 (Adénocarcinome humain de colon de grade II) (Figs. 1 et 2), IC50 à 2,24 µg/µl (1,1 mM) sur CCRF CEM (Figs. 5 et 6) et IC75 à 1,249 µg/µl (0,6 mM) sur NCI H69 (Figs. 3 et 4).

## 20 **Exemple 2: Test de mutagénicité des peptides comprenant la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 4 (test d'Ames)**

Cette étude a été effectuée selon les principes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) décrits dans OECD Principles of Good Laboratory Practice (révisé en 1997),  
25 ENV/MC/CHEM (98) 17 ; la Directive 2004/10/EC du Parlement européen et du Conseil du 11/02/2004 sur l'harmonisation des lois, des réglementations et des provisions administratives relatives à l'application des principes des bonnes pratiques de laboratoire et la vérification de leurs applications pour des test de substances chimiques (OJ No. L50 of 20.2.2004) ; French Good Laboratory Practice (Journal  
30 Officiel du 23/03/00, Arrêté du 14 mars 2000).

Le but est d'évaluer l'activité mutagène des peptides sur cinq souches de *Salmonella typhimurium* modifiées (TA98, TA1535a, TA97a, TA100, TA102) selon le test d'Ames. Le principe d'un tel test est que les souches croissent dans un milieu dépourvu d'histidine si la molécule testée est mutagène. Les souches bactériennes

*Salmonella typhimurium* (Biogenic, France) dont les géotypes sont résumés dans le Tableau 5 ci-dessous sont mises en culture pendant une nuit à 37°C avant le traitement.

Tableau 5

Souche	Mutation	Cible	Resistance Antibiotique
TA98	<i>hisD3052</i>	GC	Ampicilline
TA1535	<i>hisG46</i>	GGG	-
TA97a	<i>hisC3076</i>	CCC	Ampicilline
TA100	<i>hisG46</i>	GGG	Ampicilline
TA102	<i>hisG428</i>	TAA	Ampicilline et tétracycline

5

Les peptides sont mis en solution de manière à obtenir les concentrations suivantes: 15,5 ; 5 ; 1,5 ; 0,5 ; 0,15 ; 0,05 et 0,015 mg/ml. Finalement, les bactéries sont alors traitées avec 5000 ; 1550 ; 500 ; 155 ; 50 ; 15,5 ; 5 et 1,55 µg par boîte. Les bactéries sont également traitées avec un contrôle solvant et six contrôles positifs (le 2-aminoanthracène à 2 µg/boîte, le 2-nitrofluorène à 1 µg/ boîte, le 4 nitroquinoline N-oxide à 0.125 µg/ boîte, le sodium azide à 650 µg/ boîte, l'acridine mutagen dihydrochloride à 15 µg/ boîte et le cumene Hydroperoxide à 30 µg/ boîte) sont également préparés. Après une incubation de 72h à 37°C, les bactéries sont alors comptées et les résultats sont analysés à l'aide d'un logiciel tel que le logiciel

10 Xenomatrix™.

15

L'activité mutagène (exprimée en facteur d'induction de mutagénéicité) est ainsi déterminée:

Ratio mutagène = (Moyenne du nombre de colonies mutées suite au traitement avec la substance test) / (Moyenne du nombre de colonies mutées suite au traitement avec le solvant contrôle).

20

Les résultats sont exprimés en ratio par rapport aux contrôles négatifs (DMSO pour les contrôles positifs et eau stérile pour les molécules). Selon ce test, une molécule est mutagène si le ratio observé est supérieur à 2 et qu'un effet dose-dépendant est observé. L'ensemble des résultats a démontré que, selon le test d'Ames réglementaire, les peptides comprenant, respectivement, les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 et leurs métabolites n'ont aucun

25

effet mutagène sur les souches TA97a, TA98, TA100, TA102 et TA1535 aux concentrations testées selon les normes BPL.

**Exemple 3: Etude de la toxicité aiguë des peptides comprenant, respectivement, les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4**

Cette étude a été effectuée selon les principes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) précédemment citées. Le but de ce test est de déterminer la dose de peptide maximale tolérée. Cette dose devra être utilisée pour les études d'efficacité *in vivo*.

En fonction de leur solubilité, les peptides sont solubilisés dans du NaCl 0,9% ou du bicarbonate d'ammonium pour le peptide comprenant SEQ ID NO : 1, dans le but d'obtenir une concentration maximale et de réaliser des doses allant de 2000 mg/kg maximum à 5 mg/kg. Les souris Swiss Nude femelles sont randomisées à T0 (premier jour) avec 5 souris par groupe : un groupe contrôle (solvant) et un groupe pour chaque dose/peptide. Une souris par groupe est traitée à T0 puis observée pendant 24 heures. En fonction des signes de toxicité, les autres souris sont traitées. La viabilité, le poids des souris et le comportement sont notés une fois par jour pendant 14 jours. La perte de poids est évaluée par rapport au poids à T0 des souris. Durant l'étude, les animaux sont sacrifiés si l'un de ces éléments survient : signes de souffrance (cachexie, affaiblissement, difficulté à se mouvoir ou à manger), toxicité du produit (recroquevillement, convulsions), 25% de perte de poids sur quelques jours. Une autopsie est réalisée dans chacun de ces cas. Les souris sont sacrifiées à T13 (ou avant si une toxicité est observée) par inhalation de CO<sub>2</sub>. Une autopsie macroscopique des organes est alors réalisée pour chacune des souris. La tolérance aux peptides testés est déterminée par une analyse comparative du changement du poids corporel moyen, de la mortalité et de l'observation macroscopique des organes dans différents groupes. Les signes cliniques sont notés.

L'analyse statistique du changement de poids corporel moyen est effectuée selon le test de Bonferroni/Dunn. Tous les groupes sont comparés les uns par rapports aux autres. Une valeur  $p < 0,05$  est considérée comme significative.

La toxicité aiguë des peptides comprenant, respectivement, les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 a été évaluée selon la réglementation de l'OCDE No. 420 avec les modifications suivantes :

- la voie d'administration choisie a été la voie intraveineuse;
- la solubilité du peptide de séquence SEQ ID NO : 4 étant de 50 mg/ml, la dose maximale testée a été de 400 mg/kg (au lieu de 2000 mg/kg préconisés).
- la solubilité du peptide de séquence SEQ ID NO : 1 étant de 25 mg/ml, la dose maximale testée a été de 200 mg/kg.

5 Quatre souris par groupe (4 doses par substance testée) ont été traitées à J1 par injection intraveineuse (IV) par les peptides ou le contrôle négatif. Ces souris ont ensuite été observées durant 14 jours consécutifs, pesées 2 fois par semaine et leur analyse comportementale a été effectuée une fois par semaine. A J0, une souris par  
10 groupe a été traitée avec les doses de traitement déterminées pendant l'étude d'orientation (Dose de 5, 50, 300 et 400 mg/kg pour le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO :4. Dose de 5, 50 et 300 et 2000 mg/kg pour les peptides incorporant la séquence SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3. Dose de 5, 50, 100 et 200 pour le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO :1).

15 L'ensemble des résultats a démontré que les peptides comprenant, respectivement, les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4, administrés par voie intraveineuse chez la souris Nude se sont avérés non toxiques respectivement jusqu'à la dose de 200 mg/kg, 300 mg/kg, 300 mg/kg et 400 mg/kg.

20

**Exemple 4 : Etude de l'efficacité anti-tumorale *in vivo* des peptides comprenant, respectivement, les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4**

25 Le but de cette étude est d'évaluer l'activité anti-tumorale des 4 peptides SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 chez le rongeur athymique sur les types de cancers les plus sensibles, déterminée en fonction des résultats de l'étude *in vitro*.

30 Le peptide comprenant la séquence SEQ ID NO : 4 est testé sur la lignée cellulaire HT-29, le peptide comprenant la séquence SEQ ID NO : 3 est testé sur la lignée cellulaire A375 et le peptide comprenant la séquence SEQ ID NO : 2 est testé sur la lignée cellulaire SK-OV-3.

Les différentes lignées cellulaires sont amplifiées dans le but d'obtenir 10 millions de cellules par induction sous-cutanée. Avant l'induction tumorale, les souris

sont anesthésiées à l'aide d'isoflurane. Les tumeurs sont ensuite induites par injection de 200 µl de cellules contenues dans du milieu sans sérum. Après inoculation, les souris sont observées 2 heures post-injection. Quand le volume tumoral atteint le volume souhaité (volume mesuré avec un pied à coulisse selon la formule  $(L \times L^2)/2$  ; le  
 5 délai varie entre 10 et 60 jours selon le modèle), les souris sont traitées selon le schéma de traitement choisi.

La viabilité, le comportement des souris ainsi que le volume de la tumeur sont enregistrés 2 fois par semaine. Durant l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés si un de ces cas survient: signes de souffrance, toxicité du produit, 25% de perte de poids  
 10 sur quelques jours, croissance de la tumeur de 10% du poids du corps, tumeur ulcérate et restant ouverte, position de la tumeur interférant avec les mouvements. Une autopsie est réalisée dans chaque cas selon les principes d'éthique de l'expérimentation animale. Les souris survivantes sont sacrifiées quand les tumeurs atteignent un volume maximum de 2000 mm<sup>3</sup>. Chaque tumeur est collectée  
 15 immédiatement, incluse dans du réactif TissueTek OCT fixative reagent (Réf. 4583, Bayer, France) et congelée dans de l'isopentane (2-methylbutane; Réf. 27034-2, Aldrich, France) et de l'azote liquide. Les échantillons de tumeur sont stockés à -80°C.

Pour tous les animaux, la taille de la tumeur est mesurée deux fois par semaine  
 20 et les courbes individuelles sont tracées. Sont calculés :

- Les courbes de croissance tumorale (tracées en fonction des volumes tumoraux moyens) (VTM),
- Les courbes de volume tumoral moyen relatif (VTMR),
- Le temps de doublement tumoral (TD) (défini comme la période nécessaire  
 25 pour obtenir un volume tumoral moyen de 200%),
- L'inhibition de la croissance tumorale (T/C%) (déterminée comme le ratio des volumes tumoraux des animaux traités *versus* le groupe contrôle),
- Le délai de croissance spécifique (SGD) calculé en fonction de la formule suivante:

30

$$\text{SGD} = \frac{(\text{TD} - \text{TD solvant})}{(\text{TD solvant})}$$

- Le temps nécessaire pour atteindre un volume V défini (TTRV).

Les animaux avec une tumeur plus petite que la limite pré-définie sont considérés comme un échec d'implant tumoral et sont exclus de l'étude le jour du traitement.

5        Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel VisualStat® Professional software (Visualstat Computing, USA).

Les analyses statistiques du changement de poids corporel moyen, des volumes tumoraux, du temps de doublement, du volume tumoral relatif et de l'inhibition de la croissance tumorale sont effectuées par l'utilisation du test Bonferroni/Dun. Tous les  
10 groupes sont comparés les uns par rapport aux autres.

**a) Efficacité anti-tumorale *in vivo* d'un peptide comprenant la séquence SEQ ID NO : 4 (peptide nommé K092D)**

15        Afin d'évaluer l'efficacité antitumorale du peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 contre les tumeurs de colon, les cellules tumorales HT29 ont été injectées (10x10<sup>6</sup> cellules/200 µl) sur le flanc droit des souris Nude. Quatre jours plus tard, les souris ont été randomisées selon le volume tumoral (56-58 mm<sup>3</sup>) et traitées pendant 5  
20 jours consécutifs avec ce peptide aux doses de 10, 60 et 130 mg/kg par injection intraveineuse (IV) (une injection par jour pendant 5 jours (Q1D\*5)). Un groupe témoin a été traité par CPT-11, un analogue de la camptothécine, inhibiteur spécifique de la topoisomérase I, qui a démontré son efficacité dans le traitement des cancers colorectaux. Le volume tumoral de chaque animal a été mesuré 2 fois par semaine pendant 25 jours. L'activité du peptide est évaluée par le volume tumoral moyen  
25 (VTM) (Fig. 25) et par le ratio T/C% (médiane volume tumoral groupe traité/médiane volume tumoral groupe contrôle négatif) (Fig. 26). Selon les critères du National Cancer Institute (NCI), une molécule est un très bon candidat anticancéreux quand le ratio T/C% est inférieur à 42%.

Les souris traitées par peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 (IV) et le  
30 groupe contrôle positif CPT-11 (une injection intrapéritonéale (IP) par semaine pendant 5 semaines) sont comparés au groupe contrôle (groupe ayant reçu le solvant).

Le modèle a été validé avec le contrôle positif CPT-11 qui a permis de mettre en évidence une activité antitumorale débutant à J5 (5<sup>ème</sup> jour) (T/C% = 86%) et s'accroissant jusqu'à J52 (T/C% = 47%) (Fig. 26).

A J10, J14, J22 et J38, les VTM et VTMR des groupes non traités et solvants étaient supérieurs à ceux des groupes traités avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 à 10, 60 et 130 mg/kg (Fig. 25).

Le T/C% des groupes traités avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 ont diminué entre J0 et J22 (70,29% pour le groupe traité à 10 mg/kg et 52,05% pour le groupe traité à 60 mg/kg à J22) et restent faibles jusqu'à J38 (69,68% (10 mg/kg) à 78,64% (130 mg/kg)). L'analyse du paramètre T/C% permet donc de conclure à une activité antitumorale pour le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 avec un effet dose-dépendant. De plus, on remarque que ces effets ont été observés plusieurs semaines après la fin des traitements.

Dès J5, le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 à la dose de 60 mg/kg (30  $\mu\text{mol/kg}$ ) a montré un début d'activité (T/C = 88%), comparable au CPT-11 (40  $\mu\text{mol/kg}$ ). A J22, il a été observé une activité antitumorale pour ce peptide (T/C=52% à 60 mg/kg soit 30  $\mu\text{mol/kg}$ ) comparable à celle du CPT-11 (T/C= 48%) (40  $\mu\text{mol/kg}$ ). Ces résultats sont particulièrement intéressants car le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 est plus actif que le CPT-11 si l'on raisonne en termes de moles. De plus, le schéma de traitement doit également être pris en compte sachant que le peptide a été injecté seulement de J0 à J4 à raison d'une administration par jour alors que le CPT-11 a été administré une fois par semaine pendant 5 semaines.

Par conséquent, le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 4 a montré une activité antitumorale dose-dépendante contre le modèle HT-29 de cancer du colon. Cette activité a été démontrée par les différents paramètres VTM, VTMR, T/C et TTRV.

#### 25 **b) Efficacité anti-tumorale *in vivo* d'un peptide comprenant la séquence SEQ ID NO : 3 (peptide nommé K092C)**

Afin d'évaluer l'efficacité antitumorale du peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 3 contre les tumeurs de mélanome, des cellules tumorales A375 ont été injectées sur le flanc droit des souris Nude, à raison de  $10 \times 10^6$  cellules/200  $\mu\text{l}$ . Lorsque les volumes tumoraux ont atteint une moyenne de 800  $\text{mm}^3$ , les souris ont été randomisées et traitées pendant 4 jours consécutifs avec 50  $\mu\text{l}$  pour 800  $\text{mm}^3$ , d'une solution de ce peptide à 12,5 mg/ml par injection intratumorale (IT), soit une dose de 25 mg/kg. Un groupe contrôle a reçu le solvant uniquement. Le volume tumoral de

chaque animal a été mesuré 2 fois par semaine pendant 10 jours. L'activité du peptide est évaluée par le volume tumoral moyen (VTM) (Fig. 27) et le ratio T/C% (médiane volume tumoral groupe traité/médiane volume tumoral groupe contrôle négatif) (Fig. 28).

5 Les souris traitées avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 3 sont comparées au groupe contrôle (solvant) dont le pH a été ajusté à celui du peptide en solution dans du NaCl 0.9% (IT).

A J10 (10<sup>ème</sup> jour), le VTM était  $2274,93 \pm 286,82$  pour le groupe contrôle et  $1812,97 \pm 335,20$  pour le groupe traité le peptide incorporant la séquence SEQ ID  
10 NO : 3 à 25 mg/kg. Les VTMR correspondants (J0-J10) étaient de  $2,98 \pm 0,48$  pour le groupe traité avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 3 à 25 mg/kg et de  $2,24 \pm 0,49$  mm<sup>3</sup> pour le groupe contrôle. Ces valeurs sont significativement différentes.

Le T/C% du groupe traité avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO :  
15 3 a diminué de 86,73% à 69,82% entre J6 et J10 confirmant que ce peptide a une activité antitumorale.

De plus, le temps de doublement (TD), c'est à dire le temps nécessaire pour qu'une tumeur double de volume, a été mesuré au cours de la phase de croissance exponentielle des tumeurs entre 850 et 1750 mm<sup>3</sup>. Les valeurs de TD étaient de  
20  $5,77 \pm 2,20$  jours pour le groupe contrôle et  $9,81 \pm 2,91$  jours pour le groupe traité avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 3 à 25mg/kg. Ces valeurs sont significativement différentes et montrent un effet du peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 3.

Les valeurs de SGD sont également significativement différentes avec une  
25 valeur SGD de  $0,00 \pm 0,38$  pour le groupe contrôle et de  $0,70 \pm 0,50$  pour le groupe traité avec le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 3.

Par conséquent, l'analyse des paramètres T/C, VTM, VTMR, TD, SGD, dont les valeurs sont significativement différentes entre les groupes, a permis de mettre en évidence une activité antitumorale importante du peptide incorporant la séquence SEQ  
30 ID NO : 3 administré par injection intra-tumorale (IT) à 25 mg/kg. De plus, il est important de noter que ce peptide s'est révélé très efficace malgré les volumes tumoraux relativement importants (environ 800 mm<sup>3</sup>) au moment des traitements.

**c) Efficacité anti-tumorale *in vivo* d'un peptide comprenant la séquence  
SEQ ID NO : 2 (peptide nommé K092B)**

Afin d'évaluer l'efficacité antitumorale du peptide incorporant la séquence SEQ  
5 ID NO : 2 à l'encontre des tumeurs ovariennes, des cellules tumorales SK-OV3 ont  
été injectées, à raison de  $10 \times 10^6$  cellules/200  $\mu$ l, sur le flanc droit des souris Nude.  
Lorsque les volumes tumoraux ont atteint une moyenne de 325 mm<sup>3</sup>, les souris ont été  
randomisées et traitées 4 fois à raison d'un traitement tous les 2 jours aux doses de 25  
10 mg/kg et 130 mg/kg en injection intratumorale (IT). Le volume tumoral de chaque  
animal a été mesuré 2 fois par semaine pendant 11 jours. L'activité du peptide est  
évaluée par le volume tumoral moyen (VTM) (Fig. 29) et le ratio T/C% (médiane  
volume tumoral groupe traité/médiane volume tumoral groupe contrôle négatif) (Fig.  
30). Les souris traitées par le peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 2 (en IT)  
sont comparées à un groupe contrôle recevant du solvant dont le pH a été ajusté à  
15 celui de ce peptide en solution dans du NaCl 0.9% (IT).

Au cours de l'étude, deux tumeurs de souris traitées avec le peptide incorporant  
la séquence SEQ ID NO : 2 ont totalement disparu, dont une tumeur d'une souris  
traitée avec le peptide injecté à 25 mg/kg et une tumeur traitée avec le peptide injecté  
à 130 mg/kg.

20 A J11, le VTMR du groupe contrôle et des groupes traités à l'aide du peptide  
incorporant la séquence SEQ ID NO : 2 à 130 mg/kg et à 25 mg/kg était de  $2,23 \pm$   
 $0,25$ , de  $1,52 \pm 0,61$  et de  $1,69 \pm 0,91$  mm<sup>3</sup>, respectivement.

A la même date, le paramètre T/C% du groupe traité avec 25 mg/kg de peptide  
incorporant la séquence SEQ ID NO : 2 était de 107,03% et celui du groupe traité  
25 avec 130 mg/kg de ce même peptide était de 72,90%. Cette analyse confirme l'activité  
antitumorale de ce peptide injecté à raison de 130mg/kg.

De plus, le temps de doublement (TD) a été mesuré au cours de la phase de croissance  
exponentielle des tumeurs entre 500 et 1000 mm<sup>3</sup>. Ces valeurs de TD des groupes  
contrôles, peptide à 130 mg/kg et peptide à 25 mg/kg étaient de  $10,50 \pm 3,56$ , de  $13,04$   
30  $\pm 2,85$  et de  $8,54 \pm 1,97$  jours, respectivement.

Les valeurs SGD étaient de  $0,00 \pm 0,34$  pour le groupe contrôle, de  $0,24 \pm 0,27$   
pour le groupe peptide à 130 mg/kg et de  $-0,19 \pm 0,19$  pour le groupe peptide à 25  
mg/kg.

Les valeurs de TTRV ( $600 \text{ mm}^3$ ) étaient de  $9,20 \pm 6,72$  jours pour le groupe contrôle, de  $11,75 \pm 5,91$  jours pour le groupe peptide à 130 mg/kg et de  $7,25 \pm 5,19$  jours pour le groupe peptide à 25mg/kg.

Par conséquent, même si aucune différence n'était significative, l'étude des  
5 paramètres TD, VTM, VTMR, T/C% et TTRV a permis de mettre en évidence une  
activité antitumorale du peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 2 administré  
par injection intratumorale à une dose de 130 mg/kg. Cette conclusion est renforcée  
par le fait que la tumeur d'une souris traitée à une dose de 130 mg/kg (IT) avec le  
peptide incorporant la séquence SEQ ID NO : 2 a totalement disparu au cours de  
10 l'étude.

## REVENDICATIONS

- 1) Peptide isolé et purifié à partir de testicules de la roussette de la classe des Sélaciens caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de, une séquence en acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4 ou encore présente entre 70 et 99% d'identité avec l'une desdites séquences.
- 2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente entre 75 et 95%, plus préférentiellement entre 85 et 95% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 1 à 4.
- 3) Peptide selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation en tant que médicament, plus précisément dans la prévention et/ou le traitement du cancer.
- 4) Peptide selon la revendication 3, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement du cancer du colon, du cancer du sein hormono-dépendant, de la leucémie aigue promyélocytaire, du cancer de l'ovaire, du mélanome, du cancer du poumon à petites cellules.
- 5) Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite séquence est la séquence SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :1, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement du carcinome mammaire humain hormono-dépendant ou de la leucémie aigue promyélocytaire, préférentiellement du carcinome mammaire humain hormono-dépendant.
- 6) Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite séquence est la séquence SEQ ID NO :2, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :2, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de l'adénocarcinome humain de l'ovaire, le mélanome humain ou le carcinome pulmonaire humain à petites cellules , préférentiellement de l'adénocarcinome humain de l'ovaire.
- 7) Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce-que ladite séquence est la séquence SEQ ID NO : 3, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :3, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement du mélanome humain, du carcinome pulmonaire humain à petites cellules ou de la leucémie aiguë promyélocytaire, préférentiellement du mélanome humain.

8) Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite séquence est la séquence SEQ ID NO : 4, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :4, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de l'adénocarcinome humain du colon, de la leucémie aiguë promyélocytaire ou du  
5 carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement, de l'adénocarcinome humain du colon.

9) Peptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la roussette est *Scyliorhinus canicula*.

10) Vecteur de délivrance comprenant au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications précédentes.

11) Composition pharmaceutique comprenant, dans un support acceptable sur le plan pharmaceutique, au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9.

15) Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la séquence est SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :1, pour le traitement et/ou la prévention du carcinome mammaire humain hormonaux dépendant ou de la leucémie aiguë promyélocytaire, préférentiellement du carcinome mammaire humain hormono-dépendant.

20) Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la séquence est SEQ ID NO : 2, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :2, pour le traitement et/ou la prévention de l'adénocarcinome humain de l'ovaire, le mélanome humain ou le carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement de l'adénocarcinome humain de l'ovaire.

25) Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la séquence est SEQ ID NO : 3, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :3, pour le traitement et/ou la prévention du mélanome humain, du carcinome pulmonaire humain à petites cellules ou de la leucémie aiguë promyélocytaire, préférentiellement du mélanome humain.

30) Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la séquence est SEQ ID NO : 4, ou une séquence présentant entre 70 et 99% d'identité avec SEQ ID NO :4, pour le traitement et/ou la prévention de l'adénocarcinome humain du colon, de la leucémie aiguë promyélocytaire ou du

carcinome pulmonaire humain à petites cellules, préférentiellement, de l'adénocarcinome humain du colon.

5       16) Acide nucléique comprenant une séquence nucléique codant pour un peptide comprenant, ou constitué de, ou présentant entre 70 et 99% d'identité avec, une séquence en acides aminés choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 4, ou encore une séquence nucléique complémentaire de ladite séquence codante.

      17) Cassette d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 16.

10       18) Vecteur de clonage et/ou d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 16.

## PL 1/7

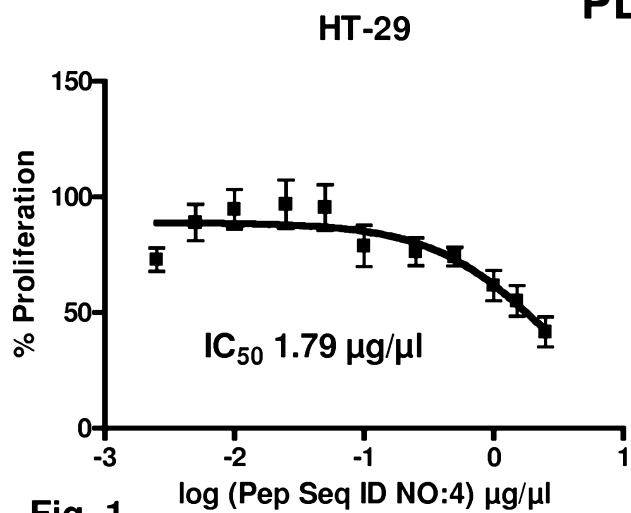


Fig. 1

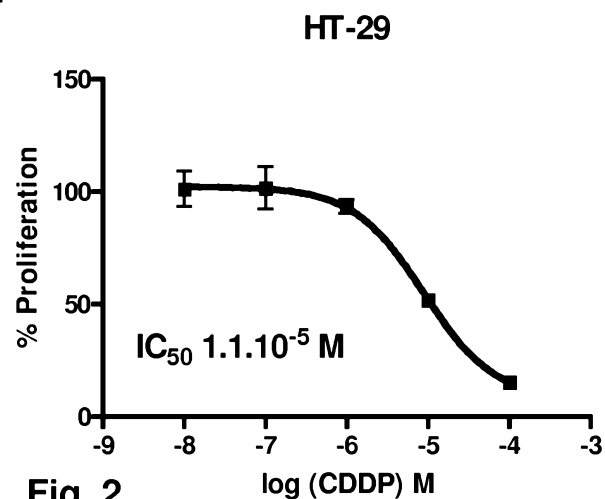


Fig. 2

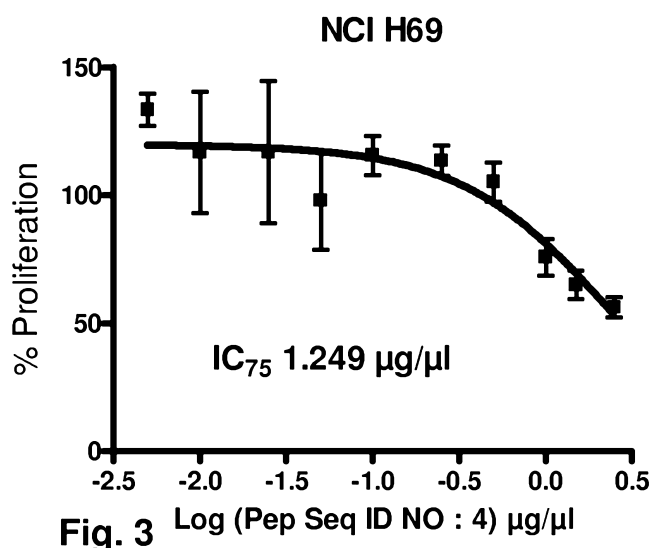


Fig. 3

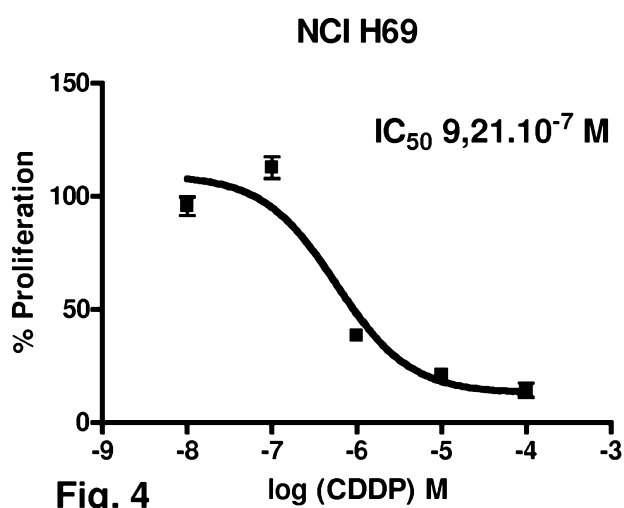


Fig. 4

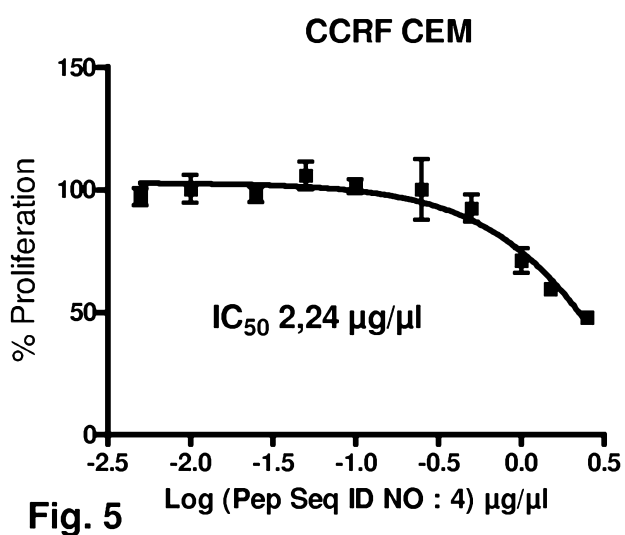


Fig. 5

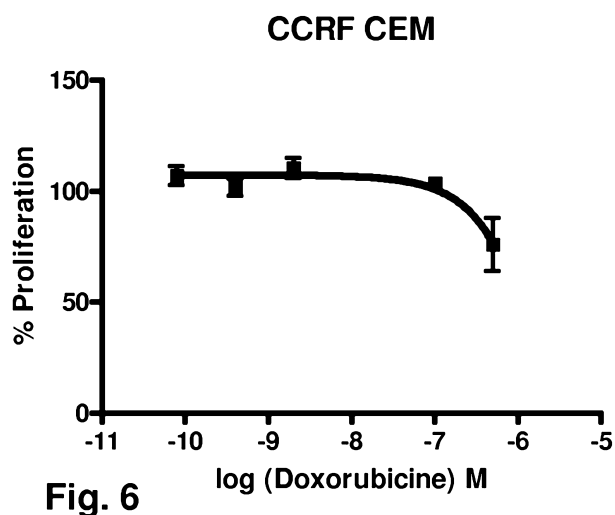
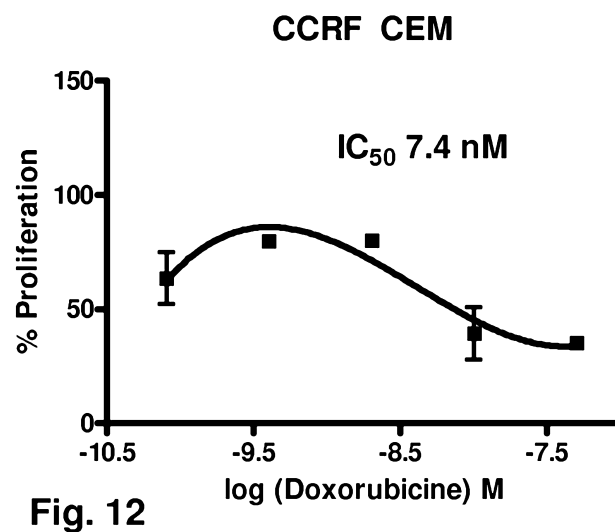
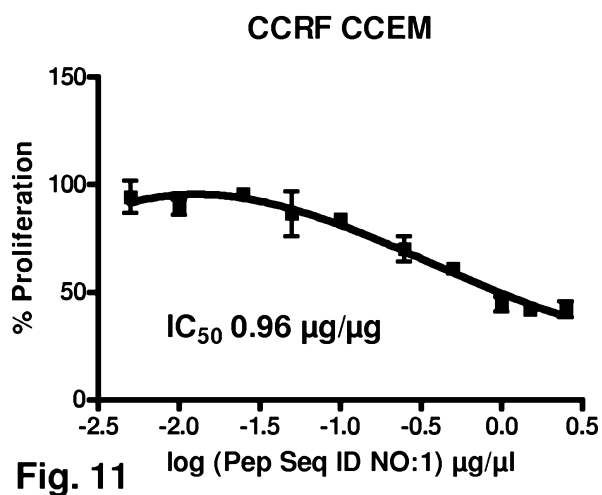
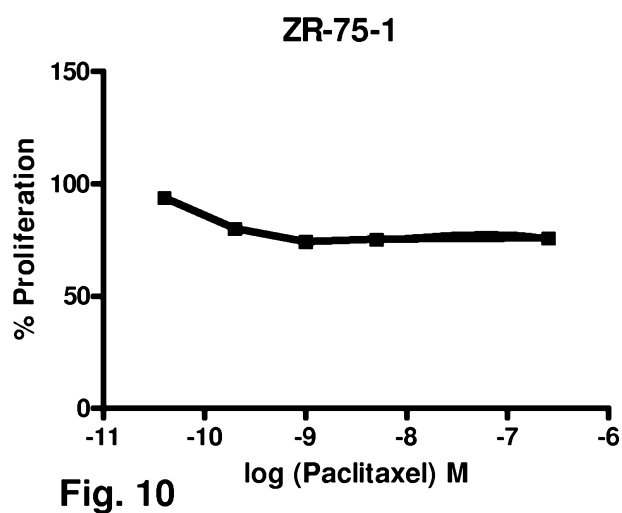
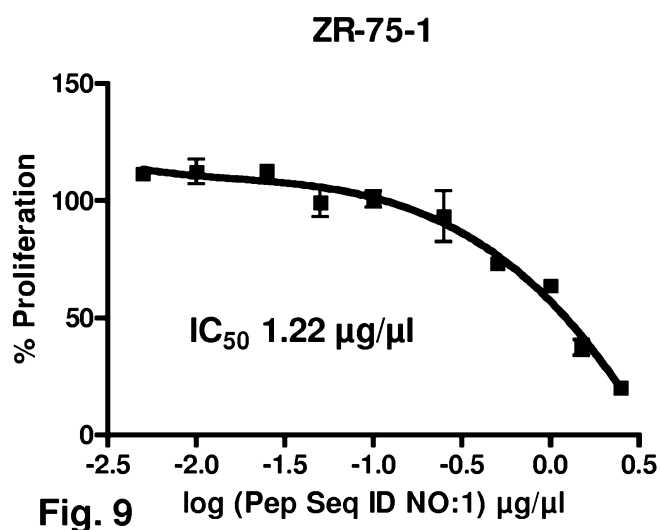
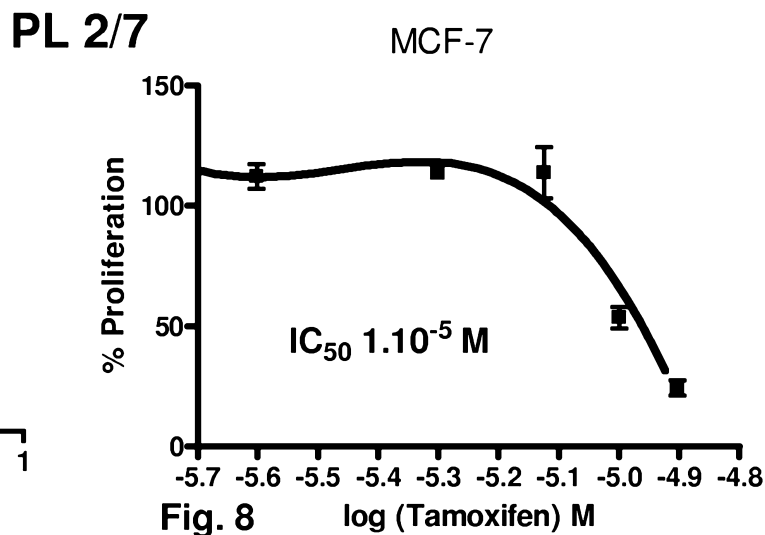
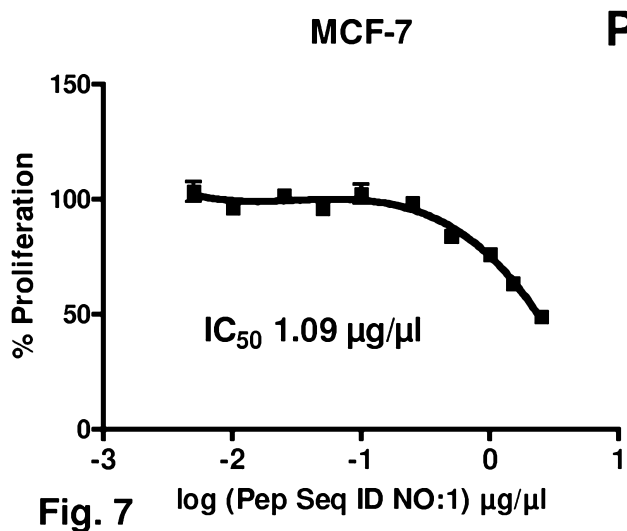


Fig. 6



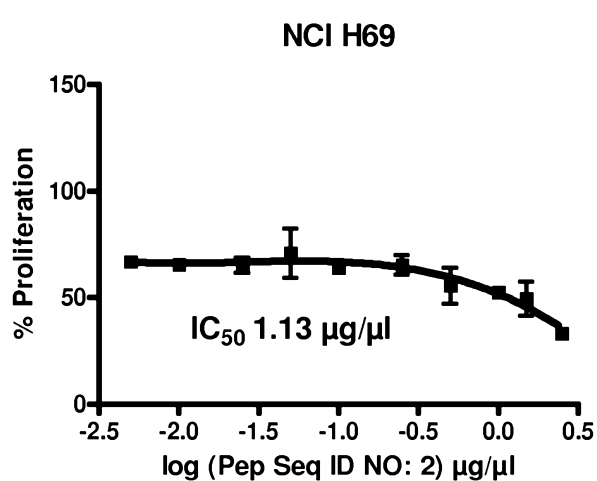


Fig. 13

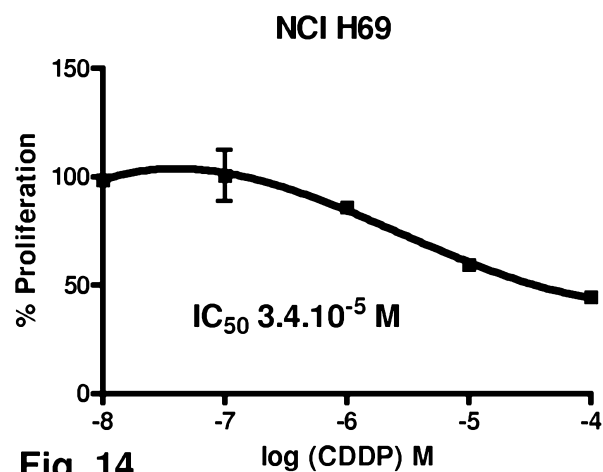


Fig. 14

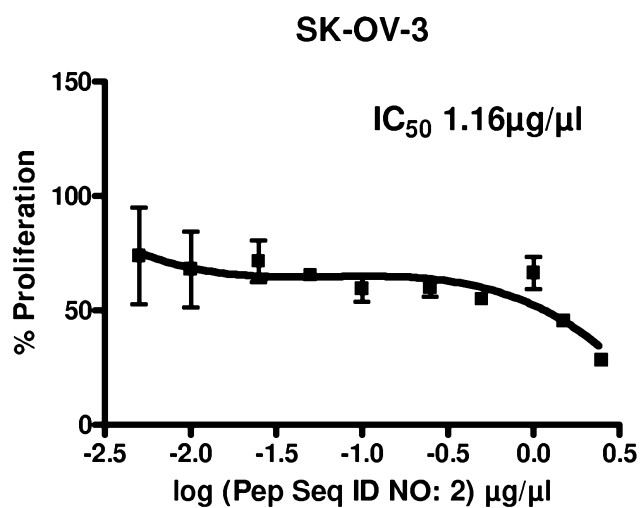


Fig. 15

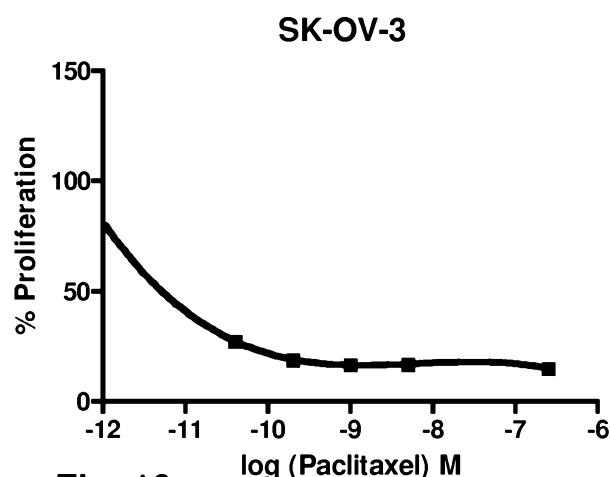


Fig. 16

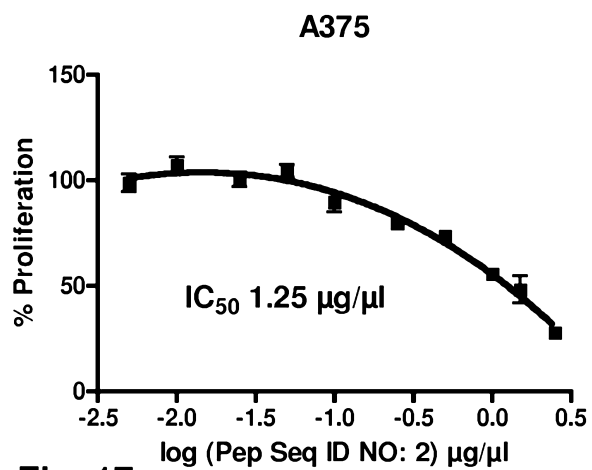


Fig. 17

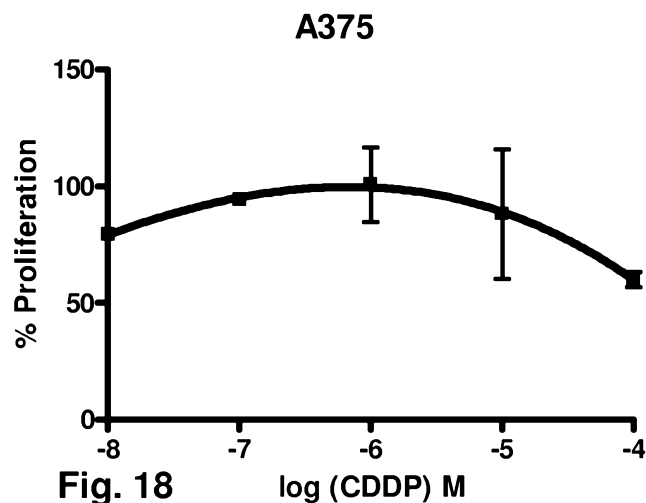


Fig. 18

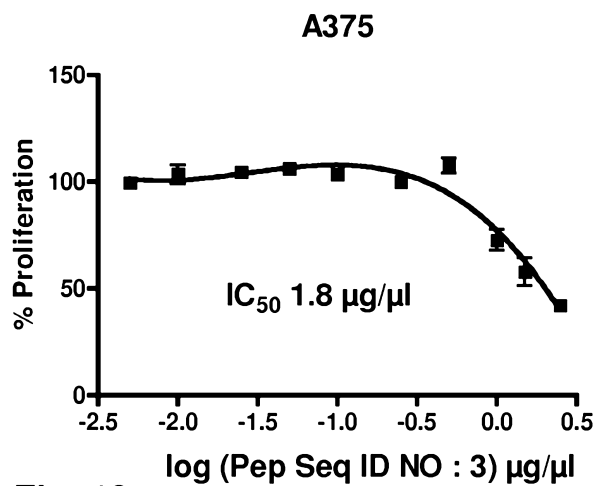


Fig. 19

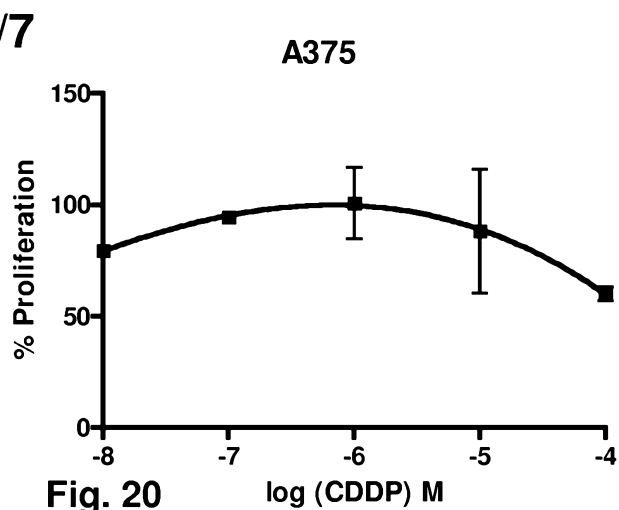


Fig. 20

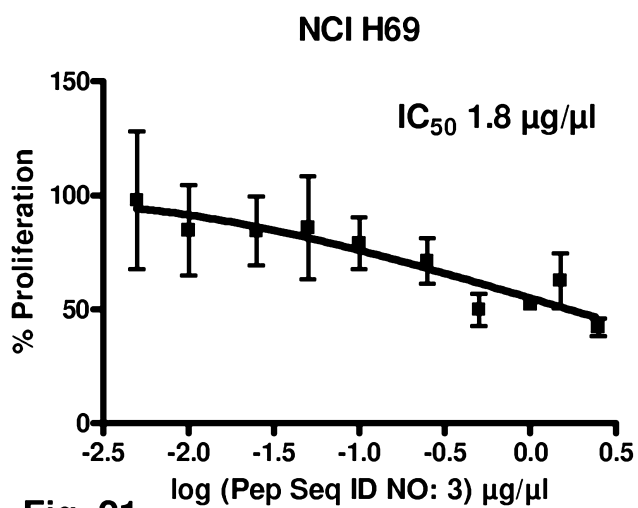


Fig. 21

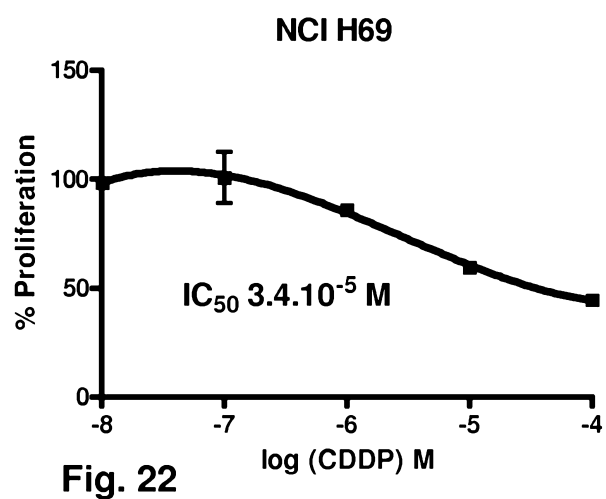


Fig. 22

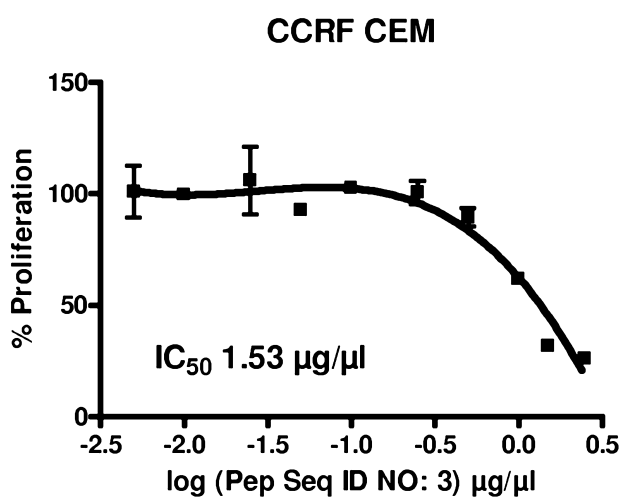


Fig. 23

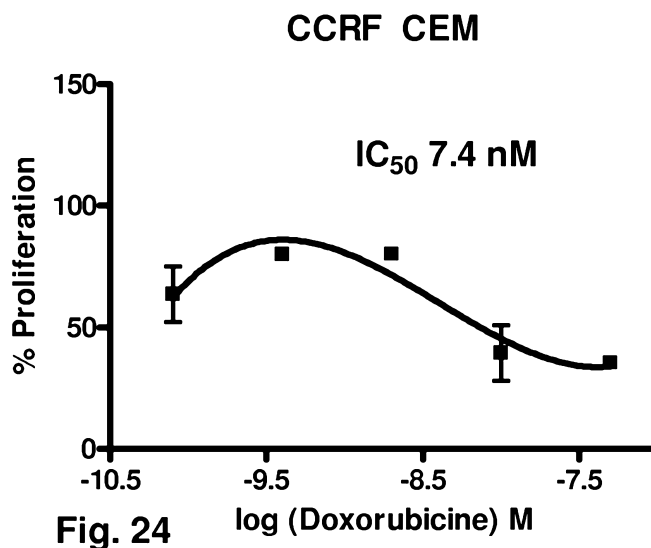


Fig. 24

PL5/7

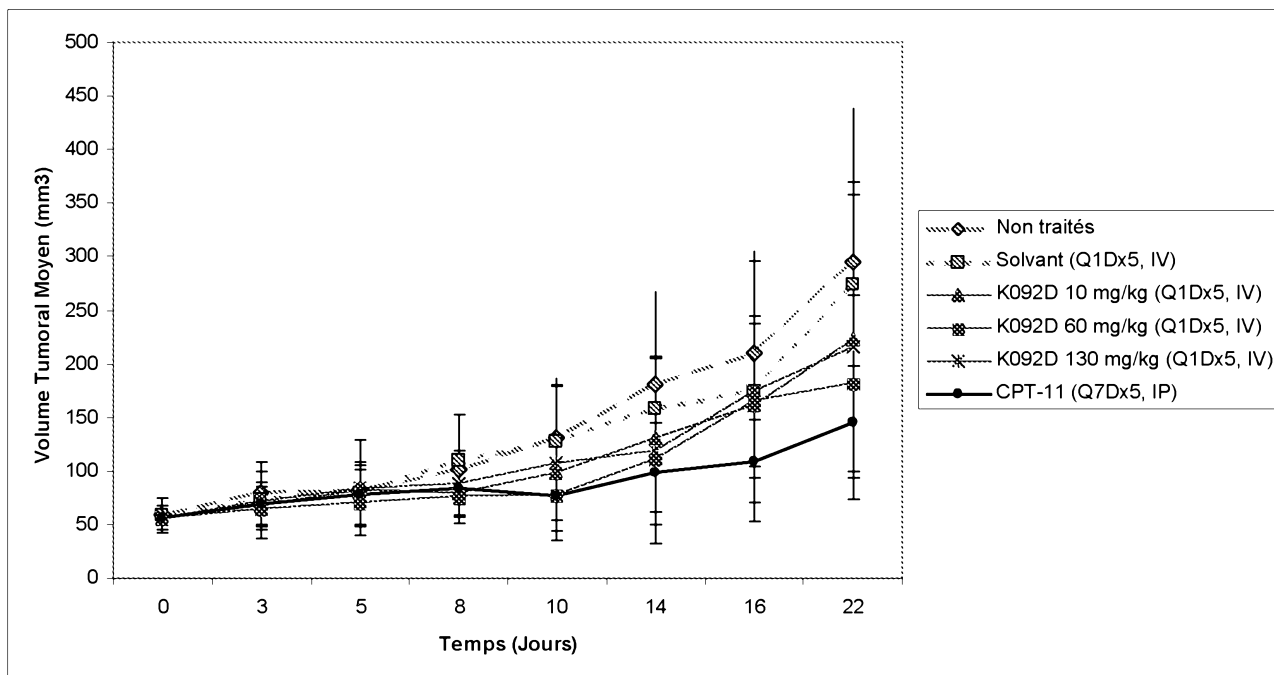


Fig. 25

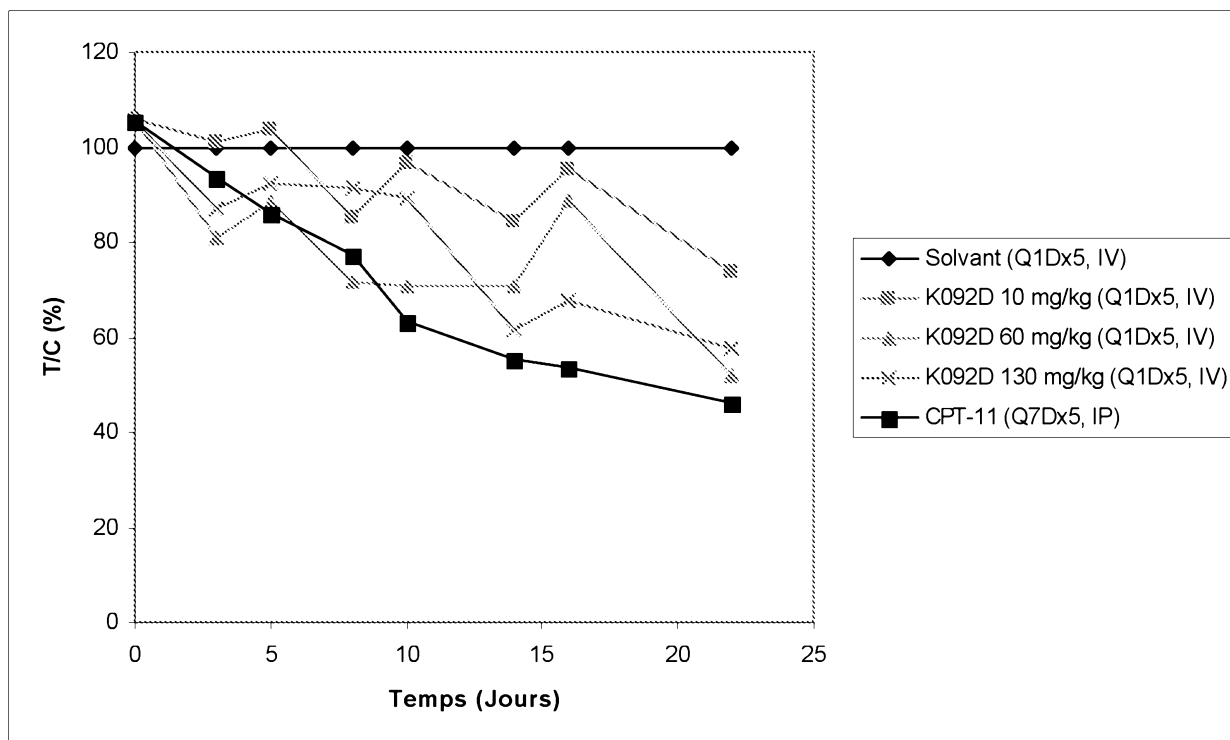


Fig. 26

PL 6/7

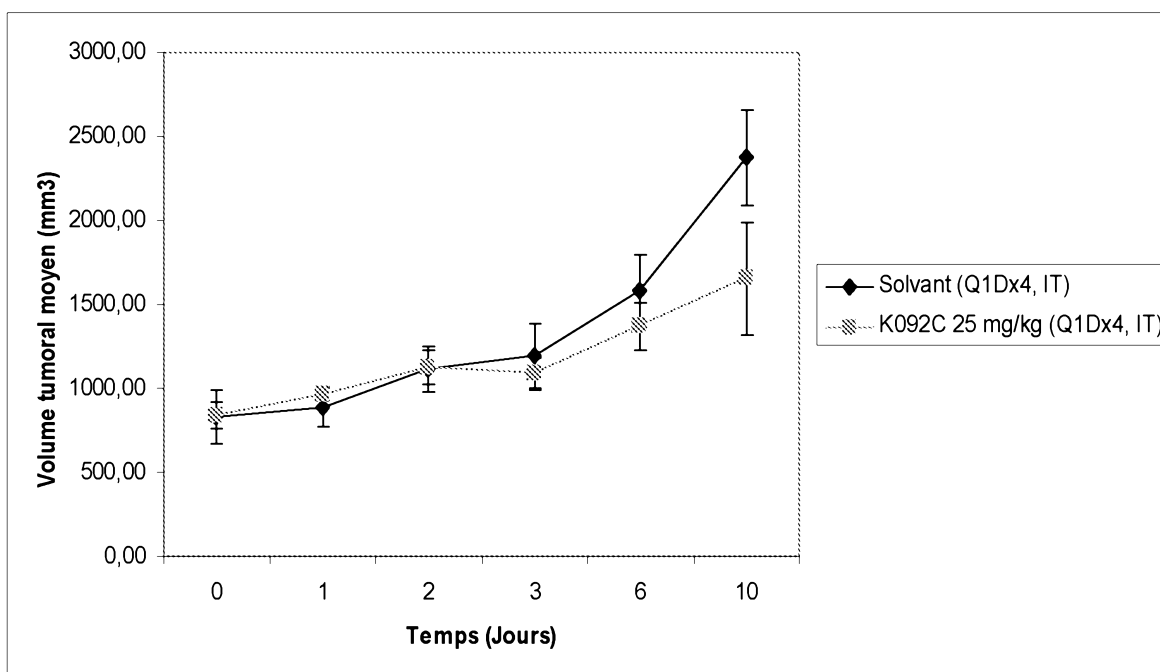


Fig. 27

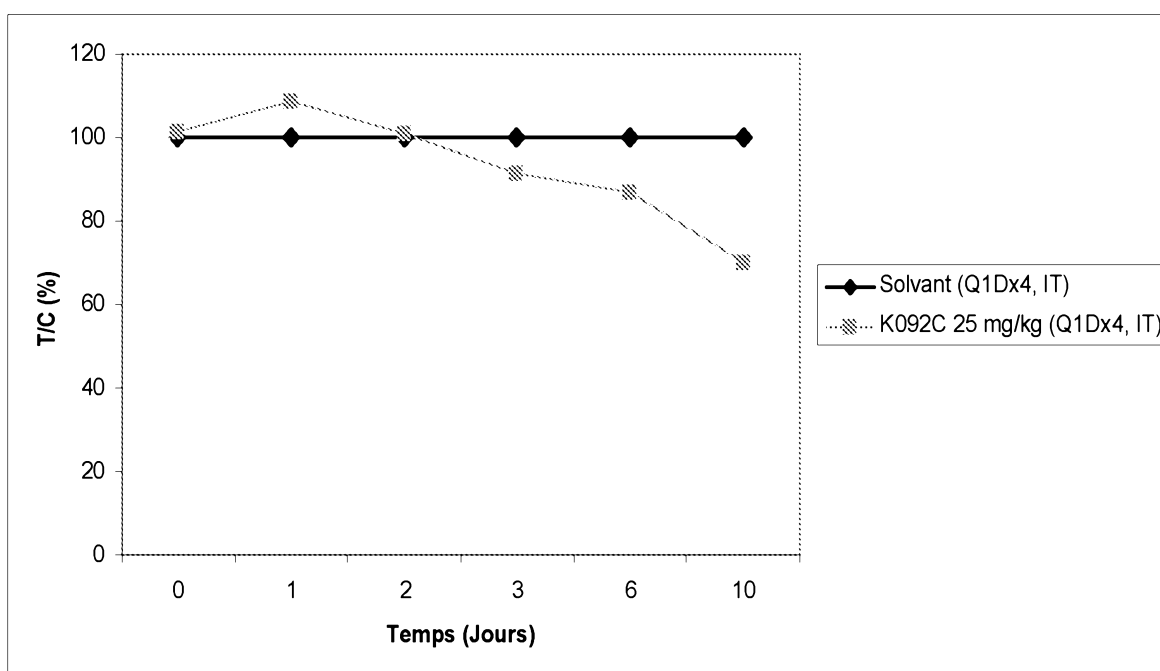


Fig. 28

PL 7/7

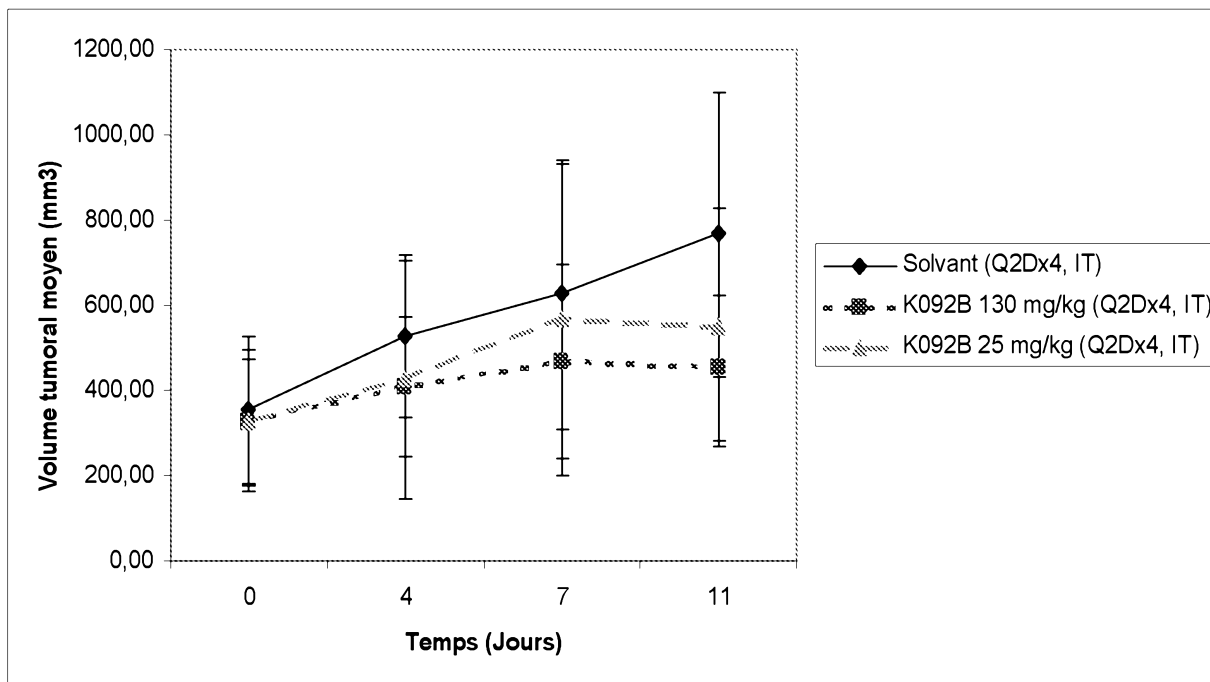


Fig. 29

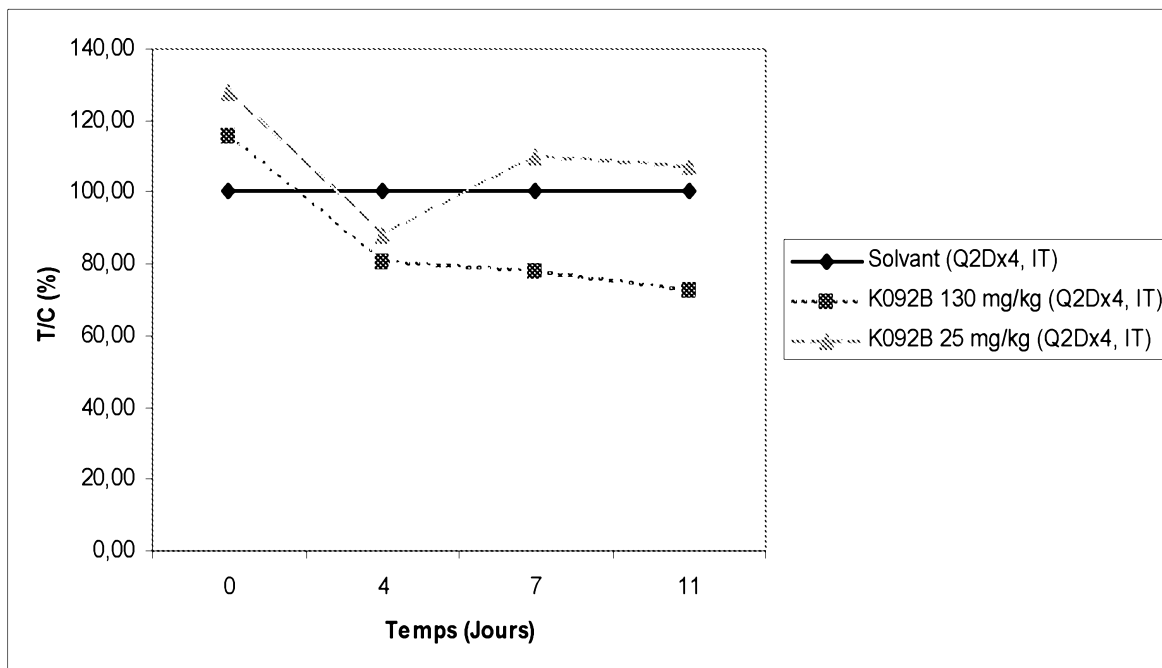


Fig. 30



## Sequence Listing.ST25 102260

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(19)

&lt;400&gt; 4

Gln Leu Thr Pro Glu Ala Leu Ala Asp Glu Glu Glu Met Asn Ala Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Arg

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

Geraldine Magnan: "Saint-Malo, nouveau site pour les biotechnologies", BIOTECH.INFO, no. 336 6 décembre 2006 (2006-12-06), pages 1-8, XP002668635, Extrait de l'Internet:

URL:<http://www.grenoble.inra.fr/Docs/docu/>

Biotech%20Info/BT2006/Biotech-336.pdf [extrait le 2011-02-01]

Serge Marshall: "BIOTECHNOLOGIES : C.RIS PHARMA AGIT DANS LES DOMAINES DE LA CANCÉROLOGIE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA COSMÉTIQUE", Bretagne économique, no. 195 28 août 2009 (2009-08-28), pages 1-44, XP002668636, Extrait de l'Internet:

URL:<http://www.bretagne-economique.com/IMG>

/pdf/Archive\_No\_195\_septembre\_2009.pdf [extrait le 2012-02-01]

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

DATABASE GenBank [Online] 12 septembre 2006 (2006-09-12), Kawakami et al.: "Homo sapiens unnamed protein product", XP002668637, Database accession no. BAB15703

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT

<b>3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES</b>