



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/47, A61K 38/17, 48/00, 31/70 // C12N 15/12, 15/86</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/16459 (43) Date de publication internationale: 9 mai 1997 (09.05.97)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01690 (22) Date de dépôt international: 28 octobre 1996 (28.10.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/12871 31 octobre 1995 (31.10.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR) (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEROUX, Aude [FR/FR]; 4, allée d'Alsace, F-94550 Chevilly-Larue (FR). BRANELLEC, Didier [FR/FR]; 1, rue Saint-Benoît, F-94210 La Varenne-Saint-Hilaire (FR). DENEFFLE, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés de Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). (74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: USE OF PROTEIN GAX FOR TREATING CANCER</p>		
<p>(54) Titre: APPLICATION DE LA PROTEINE GAX AU TRAITEMENT DE CANCERS</p>		
<p>(57) Abstract The therapeutical use, particularly in cancer treatment, of a nu leic acid coding for all or part of protein GAX or a variant thereof, is disclosed.</p>		
<p>(57) Abrégé La présente invention se rapporte à l'utilisation thérapeutique, notamment pour le traitement du cancer, d'acide nucléique codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Letonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

APPLICATION DE LA PROTEINE GAX
AU TRAITEMENT DE CANCERS

La présente invention concerne une nouvelle méthode pour le traitement des cancers. Plus particulièrement, elle concerne une méthode de traitement des cancers par blocage de la prolifération cellulaire laquelle peut être dérégulée dans les cellules
5 tumorales exprimant un oncogène tel que ras muté ou déficientes pour un gène suppresseur de tumeur tel que p53. Elle concerne également l'utilisation des vecteurs de thérapie génique permettant de réguler celle-ci, ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant.

Les produits des gènes ras, généralement désignés protéines p21, jouent un
10 rôle clé dans le contrôle de la division cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un grand nombre de tumeurs humaines a été associé à la présence de gènes ras modifiés. De même, une surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la
15 prolifération cellulaire.

Dans un contexte cellulaire normal, cette prolifération des oncogènes est vraisemblablement contrée, au moins en partie, par la génération de gènes dits suppresseurs de tumeurs comme p53 et Rb. On sait ainsi que la protéine p53, au moins sous sa forme sauvage, est un facteur de transcription qui régule négativement
20 la croissance et la division cellulaire et qui, dans certaines situations, est capable d'induire l'apoptose (Yonish-Rouach et al., Nature, 352, 345-347, 1991). Ces propriétés se manifestant en situation de stress où l'intégrité de l'ADN cellulaire est menacée, p53 a été suggérée être un « gardien du génome ». Toutefois, certains phénomènes peuvent venir perturber ce mécanisme d'autorégulation cellulaire et
25 favoriser alors le développement d'un état néoplasique. Un de ces événements consiste en des mutations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs. C'est ainsi que des formes inactivées du gène Rb ont été mises en cause dans différentes tumeurs, et notamment dans les rétinoblastomes ou dans les cancers méenchymateux comme les ostéosarcomes et qu'il a été noté la présence de p53 mutées dans environ
30 40 % des tumeurs humaines, tous types confondus (pour revues, voir Montenarh, Oncogene, 7, 1673-1680, 1992 ; Oren, FASEB J., 6, 3169-3176, 1992 ; Zambetti and Levine, FASEB J., 7, 855-865, 1993).

En conséquence, la mise en évidence de composés biologiques susceptibles d'interférer à l'encontre de ce type de dérèglement de la prolifération cellulaire et/ou de suppléer à ce type de déficience en gènes suppresseurs de tumeurs est par conséquent d'un intérêt majeur dans l'approche thérapeutique de la cancérogenèse.

5 La présente invention résulte précisément en partie de la mise en évidence que la protéine GAX constitue un inhibiteur potentiel de la prolifération cellulaire induite par les protéines ras. Elle résulte en particulier de la mise en évidence qu'une prolifération cellulaire, dérégulée dans des cellules tumorales, peut être rétablie en y exprimant la protéine GAX.

10

La protéine GAX est une protéine de 303 acides aminés. Sa séquence a été caractérisée et son cDNA cloné (Gorski et al., Mol.Cell.Biol. 1993, 6, 3722-3733). Le gène *gax* (growth arrest specific homeobox) appartient à la famille des gènes homéotiques. Ces gènes codent pour des facteurs transcriptionnels qui contiennent des séquences consensus (ou homéodomains) reconnaissant des régions spécifiques de l'ADN (ou homéoboîtes) (revue : Gehring et al. Cell, 78 : 211-223, 1994). L'homéodomaine de la protéine *gax* de rat est compris entre les acides aminés 185 et 245. Ce gène possède certaines propriétés similaires aux gènes *gas* et *Gadd* puisqu'il semble également contrôler la transition G0/G1 du cycle cellulaire. Ainsi les niveaux d'ARNm de *gax* sont réduits dans les CMLV de rat d'un facteur 10 après deux heures d'exposition au PDGF (Gorski et al., Mol.Cell.Biol. 1993, 6, 3722-3733). L'expression du gène *gax* est donc réprimée au cours de la réponse mitogénique des CMLV. Ces observations ont leur contrepartie in vivo puisque chez le rat, l'hyperplasie intinale provoquée par l'abrasion de la carotide est associée à une forte baisse de l'expression de *gax* (Weir et al. J. Biol. Chem. 1995, 270, 5457-5461).

25

L'expression du gène *gax* a été mise en évidence dans le système cardiovasculaire, notamment le cœur et l'aorte et jusqu'ici l'utilisation en thérapie génique de ce gène était donc limitée au niveau de ces cellules, l'exprimant naturellement.

30

De manière inattendue, la demanderesse a découvert qu'il était possible de valoriser avantageusement une activité inhibitrice de la protéine GAX à l'égard de la prolifération cellulaire dans des cellules tumorales c'est à dire des cellules qui n'expriment pas le gène *gax* de manière endogène.

La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement efficace pour le traitement des tumeurs associées à un dérèglement de la prolifération cellulaire telles que les tumeurs du poumon non à petites cellules, les carcinomes pancréatiques et coliques, les ostéosarcomes etc.

5 La présente invention décrit également des systèmes particulièrement efficaces permettant la délivrance in vivo, directement dans les tumeurs, de tels composés et ainsi de lutter contre le développement des cancers.

Un premier objet de l'invention réside donc dans l'utilisation de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci pour la préparation d'une composition
10 pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

Plus précisément, elle se rapporte à l'utilisation d'au moins une séquence nucléique codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

15 Comme indiqué ci-avant, il peut s'agir d'un gène codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci. Au sens de la présente invention, le terme variant désigne tout mutant, fragment ou peptide possédant au moins une propriété biologique de GAX, ainsi que tout homologue de GAX obtenu à partir d'autres espèces. Ces fragments et variants peuvent être obtenus par toute technique connue de
20 l'homme du métier, et notamment par modifications génétique et/ou chimique et/ou enzymatique, ou encore par hybridation ou par clonage par expression, permettant la sélection de variants en fonction de leur activité biologique. Les modifications génétiques incluent les suppressions, délétions, mutations, etc.

La séquence nucléique mise en oeuvre peut coder pour tout ou partie la
25 protéine GAX de rat ou un de ses variants.

Le gène utilisé au sens de l'invention est préférentiellement le gène codant pour la protéine GAX de rat ou de son homologue humain. Il s'agit plus préférentiellement d'un ADNc ou d'un ADNg.

La séquence nucléique revendiquée peut être injectée telle quelle au niveau du
30 site à traiter, ou incubée directement avec les cellules à détruire ou traiter. Il a en effet été décrit que les acides nucléiques nus pouvaient pénétrer dans les cellules sans

vecteur particulier. Néanmoins, on préfère dans le cadre de la présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité extra- et intracellulaires.

5 Différents types de vecteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir de vecteurs viraux ou non viraux.

Le vecteur selon l'invention peut ainsi être un agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression de la séquence nucléique dans des cellules procaryotes ou eucaryotes. Les vecteurs chimiques ou biochimiques représentent une
10 alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transférer.

Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transférer et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à
15 travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques.

Parmi les vecteurs synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)_n, (LKKL)_n, polyéthylène imine et DEAE dextran ou
20 encore les lipides cationiques ou lipofectants sont les plus avantageux. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, etc) et différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ou liposomes. Plus récemment, il a été développé le concept de la
25 transfection ciblée, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des
30 asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit.

La séquence nucléique utilisée dans la présente invention peut être formulée en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De
35 préférence, elle est utilisée sous une forme injectable. Elle peut donc être mélangée à

tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de la séquence nucléique dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses en séquence nucléique utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un virus recombinant défectif.

Il est ainsi possible d'utiliser les adénovirus, les herpès virus, les rétrovirus et plus récemment les virus adéno associés. Ces vecteurs s'avèrent particulièrement performants sur le plan de la transfection.

La présente invention a donc pour second objet l'utilisation d'un virus recombinant défectif contenant au moins un gène inséré codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci. L'invention réside également dans l'utilisation d'un tel virus pour le traitement des cancers. Dans les vecteurs de l'invention, le gène inséré et/ou présent peut être un fragment d'ADN complémentaire (ADNc), d'ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

Généralement, le gène inséré comprend également des séquences permettant son expression dans la cellule infectée. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression dudit gène lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences de gènes eucaryotes ou viraux ou de séquences dérivées, stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non et de façon inductible ou non. A titre d'exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter, ou du

génomme d'un virus, et notamment, les promoteurs des gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, etc. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine, -actine, tubuline, etc), les promoteurs des filaments intermédiaires (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP, etc) les promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, facteur VIII, etc) les promoteurs spécifiques de tissus (promoteur de l'actine des cellules du muscle lisse), les promoteurs préférentiellement activés dans les cellules en division, ou encore les promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc.). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

Par ailleurs, le gène inséré comprend généralement, en amont de la séquence codante, une séquence signal dirigeant le polypeptide synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle de GAX, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle (celle du gène de la thymidine kinase par exemple), ou d'une séquence signal artificielle.

Les virus selon la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène inséré. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De

préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

5 Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et l'acide nucléique d'intérêt. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression
10 totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2
15 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et la séquence codant pour GAX (Cf FR94 13355). Dans les virus
20 de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être
25 préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN d'intérêt. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie
30 du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et

E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

5

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

10
15

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant la séquence nucléique d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques. L'invention concerne donc également un virus recombinant dérivé des AAV dont le génome comprend une séquence codant pour GAX bordée des ITR de l'AAV. L'invention concerne également un plasmide comprenant une séquence codant pour GAX bordée de deux ITR d'un AAV. Un tel plasmide peut être utilisé tel quel pour transférer la séquence de GAX, éventuellement incorporé dans un vecteur liposomal (pseudo-virus).

20
25
30

Concernant les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant les cellules en division. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants comportant une séquence codant pour GAX selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence codante est généralement construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Pour le traitement des cancers, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus recombinant défectif. Il est possible d'utiliser des quantités relativement faibles de principe actif (adénovirus recombinant), et permet également une action efficace et très rapide sur les sites à traiter. Les adénovirus de l'invention sont également capables d'exprimer à hauts niveaux le gène gax introduit, ce qui leur confère une action thérapeutique très efficace. De plus, en raison de leur caractère épisomal, les adénovirus de l'invention ont une persistance limitée dans les cellules prolifératives et donc un effet transitoire parfaitement adapté à l'effet thérapeutique recherché.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé et de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml. Pour les AAV et les adénovirus, des doses de 10^6 à 10^{10} pfu/ml peuvent également être utilisées. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une suspension de virions, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention est avantageusement utilisée in vivo pour la destruction de cellules en hyperprolifération (i.e. en prolifération anormale).

Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales. Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers dans lesquels un oncogène activé est impliqué. A titre d'exemple, on peut citer les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, etc.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention est plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

25 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation du plasmide pCO1.

Figure 2 : Représentation du plasmide pXL-CMV-Gax^{HA}.

Figure 3 : Représentation de l'effet de l'expression de l'AdCMV gax sur la prolifération cellulaire chez des cellules humaines tumorales H460.

30 Figure 4 : Cellules tumorales H460 traitées par l'adénovirus AdCMV gax à M.O.I. 1000 (Figure 4A), M.O.I. 100 (Figure 4B) et M.O.I. 1000 (Figure 4C).

Figure 5 : Représentation de l'effet de l'AdCMV gax sur la prolifération cellulaire chez des cellules humaines tumorales Saos.

Figure 6 : Représentation de l'effet de l'expression de l'AdCMV gax sur la prolifération cellulaire chez des cellules humaines tumorales H358.

TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les
5 extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en
gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la
purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au
phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de
l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien
10 connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature
[Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current
Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont
15 d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille
par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un
mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN
ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

20 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le
fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications
du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence
de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du
fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement
25 ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut
être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13
(1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR
30 [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-
1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être
effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les
spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

5 EXEMPLE 1 : construction du vecteur pXL-CMV-Gax^{HA} portant le gène codant pour la protéine gax de rat sous le contrôle du promoteur CMV.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur contenant l'ADNc codant pour la protéine gax (espèce : rat) et des séquences adénovirales permettant une recombinaison. L'épitope de l'hémagglutinine du virus influenza (épitope HA1), comprenant 18 acides aminés, est ajouté à l'extrémité N-terminale de la protéine gax
10 (Field et al., Mol.Cell.Biol. 8 : 2159-2165, 1988). Ce procédé d'addition d'épitope permet de suivre, notamment par des techniques d'immunofluorescence, l'expression de gax à l'aide d'anticorps dirigés contre l'épitope HA1. Outre sa sensibilité, cette méthode permet de s'affranchir du bruit de fond correspondant à l'expression de protéines gax endogènes à la fois *in vitro* et *in vivo*.

15 **1.1. Construction du plasmide pCO1 (Figure 1)**

A - Construction du plasmide pCE

Le fragment EcoRI-XbaI correspondant à l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a d'abord été cloné entre les sites EcoRI et XbaI du vecteur pIC19H. Ceci génère le plasmide pCA. Le plasmide pCA a ensuite été coupé par HinfI, ses
20 extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par EcoRI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCA qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites EcoRI et SmaI du vecteur pIC20H (Marsh et al., Gene
25 32 (1984) 481). Ceci génère le plasmide pCB. Le plasmide pCB a ensuite été coupé par EcoRI, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par BamHI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCB qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites NruI et BglII du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCE dont une caractéristique intéressante est qu'il possède les 382 premières
30 paires de bases de l'adénovirus Ad5 suivies d'un multisite de clonage.

B - Construction du plasmide pCD'

Le fragment Sau3A (3346) - SstI (3645) et le fragment SstI (3645) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 ont tout d'abord été ligaturés et clonés entre les sites ClaI et BamHI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY53. Le fragment Sall-TaqI du plasmide pPY53 préparé à partir d'un contexte dam-, contenant la partie du génome de l'adénovirus Ad5 comprise entre les sites Sau3A (3346) et TaqI (5207) a ensuite été cloné entre les sites Sall et ClaI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pCA'. Le fragment TaqI (5207) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment Sall-TaqI du plasmide pCA' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites Sall et NarI du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCC'. Le fragment NarI (5519) - NruI (6316) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment Sall-NarI du plasmide pCC' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites Sall et NruI du vecteur pIC20R. Ceci génère le plasmide pCD'.

C - Construction du plasmide pC01

Une digestion partielle par XhoI puis une digestion complète par Sall du plasmide pCD' génère un fragment de restriction qui contient la séquence de l'adénovirus Ad5, du site Sau3A (3446) au site NruI (6316). Ce fragment a été cloné dans le site Sall du plasmide pCE. Ceci génère le plasmide pC01 (figure 1), qui contient la partie gauche de l'adénovirus-Ad5 jusqu'au site HinfI (382), un multisite de clonage et le fragment Sau3A (3446) - NruI (6316) de l'adénovirus Ad5.

1.2. Construction du vecteur pXL-CMV-Gax^{HA} (cf. figure 2)

L'ADNc de Gax a été cloné entre les sites XbaI-BamHI du vecteur pCGN (Tanaka et Herr, Cell 60 : 375-386, 1990). Le vecteur pGCN-Gax résultant contient les promoteur précoce et séquence enhancer du cytomégalovirus (CMV) (-522, +72; Boshart et al, Cell, 41 : 521-530, 1985), la séquence leader de la thymidine kinase de l'Herpes simplex virus incluant le codon d'initiation AUG ainsi que les trois premiers acides aminés (+55, +104; Rusconi et Yamamoto, EMBO J., 6 : 1309-1315, 1987), la séquence codant pour l'épitope HA1, l'ADNc de gax de rat et enfin la séquence de poly adénylation du gène de β -globine de Lapin (Päbo et al, cell, 35 : 445-453, 1983).

Le vecteur pCGN-Gax a ensuite été coupé par XmnI et SfiI et le fragment obtenu, contenant promoteur, ADNc et séquence de polyadénylation, préalablement traité à la Klenow, a été introduit au site EcoRV du vecteur navette pC01 contenant

les séquences adénovirales nécessaires à la recombinaison. Le plasmide obtenu a été désigné pXL-CMV-Gax^{HA} (cf. figure 2).

EXEMPLE 2 : Construction de l'adénovirus recombinant Ad-CMVgax

5 Le vecteur pXL-CMV-Gax^{HA} préparé dans l'exemple 1 est ensuite linéarisé et cotransfecté pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

L'adénovirus Ad-CMVgax a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* 10 entre l'adénovirus Ad.RSV β gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest 90 (1992) 626) et le vecteur pXL-CMV-Gax^{HA} selon le protocole suivant : le vecteur pXL-CMV-Gax^{HA} linéarisé par l'enzyme XmnI et l'adénovirus Ad.RSV β gal linéarisé par ClaI ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi 15 générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10¹⁰ pfu/ml.

20 Les particules virales sont purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-CMVgax est conservé à -80°C dans 10 % de glycérol.

EXEMPLE 3 : Contrôle de l'expression de l'Ad-CMVgax dans des cellules tumorales humaines H460.

25 Les cellules tumorales humaines H460 dérivées d'un cancer du poumon non à petites cellules ont été transduites par l'adénovirus recombinant Ad-CMV gax et par un virus contrôle exprimant la β -galactosidase (Ad-RSV- β gal) à multiplicités d'infection (M.O.I.) croissantes (figure 3). Après 1 heure 30 d'incubation en présence 30 de la solution adénovirale, le milieu de culture comprenant 10 % de sérum foetal est renouvelé et les cellules incubées pendant une période de 48 heures. La viabilité cellulaire étant contrôlée par test d'exclusion de bleu trypan, le nombre de cellules viables par puits de culture est alors déterminé. Deux lots d'adénovirus AdCMV gax, Ad-gax et Ad-gax(2), ont été utilisés et correspondent à deux productions

indépendantes dans les cellules 293. Les activités des deux lots s'avèrent comparables et bien distinctes de l'adénovirus contrôle AdRSV β gal.

L'utilisation de Ad-RSV - β gal a préalablement permis de démontrer la capacité d'un adénovirus recombinant à transduire de manière efficace les cellules H460. Ainsi l'activité β gal nucléaire a été détectée dans plus de 75 % des cellules traitées par Ad-RSV- β gal (M.O.I. 1000). En parallèle, l'expression de la protéine gax a été mise en évidence dans les cellules transduites par Ad-CMV gax par immunofluorescence. Les efficacités de transduction des virus Ad-CMV gax et Ad-RSV- β gal se sont avérées comparables. Le traitement des cellules H460 par Ad-CMV gax est associé à une réduction de la prolifération cellulaire mais également à une cytotoxicité massive détectée 48 heures après la transduction par l'adénovirus (cf. figures 4A, 4B et 4C). Un tel effet n'est pas observé avec l'adénovirus contrôle. Ces données démontrent donc que la surexpression de la protéine gax s'accompagne d'un arrêt de la croissance des cellules H460.

De manière intéressante, les cellules H460 expriment une protéine ras mutée (Ki-ras). Nos données démontrent de manière surprenante que l'expression de la protéine gax permet de rétablir le contrôle de la prolifération cellulaire initialement dérégulée par la protéine ras modifiée. Le caractère dominant du facteur gax vis-à-vis des mutations oncogéniques de ras n'est pas restreint aux carcinomes du poumon. Des résultats similaires, à savoir un arrêt de croissance par AdCMV gax, ont été obtenus sur les cellules HCT116 dérivés d'un carcinome du côlon. Une mutation de l'oncogène ras (G13C) et du gène DCC ont été décrites dans cette lignée cellulaire (Brattain et al., Cancer Research, 41:1751-1756, 1981).

EXEMPLE 5 : Contrôle de l'expression de l'Ad-CMV-gax dans des cellules tumorales humaines à environnement p53 nul

Les cellules H358, également dérivées d'un carcinome du poumon non à petites cellules, constituent un modèle de déficience pour la protéine p53. Cette lignée cellulaire présente en effet une délétion homozygote pour le gène p53 (Maxwell and Roth, Oncogene 8 : 3421, 1993). De manière avantageuse, l'adénovirus Ad-gax bloque de manière efficace la croissance des cellules H358 et provoque une cytotoxicité massive 48 heures après la transduction adénovirale (figure 5). Cette mort cellulaire n'est pas détectée en présence d'un adénovirus contrôle Ad-RSV- β gal. Ces données démontrent que la surexpression de gax bloque de manière spécifique et

efficace la croissance des cellules tumorales déficientes pour p53. De manière intéressante, ces données ne se limitent pas aux cellules dérivées de carcinomes du poumon. En effet, la croissance des cellules humaines Saos, dérivées d'un ostéosarcome, est également bloquée après traitement par Ad-CMV gax. Les cellules

5 Saos constituent un modèle cellulaire à environnement p53 et pRb nuls. De nouveau, cet arrêt de croissance est dépendant de la concentration de virus utilisée et n'est pas observée après transduction des cellules cancéreuses par le virus contrôle (Figure 6). Ainsi plus de 90 % des cellules Saos-2 sont positives pour l'activité β gal après induction par AdRSV β gal à une multiplicité d'infection de 250. Dans les mêmes

10 conditions expérimentales (multiplicité d'infection 250), AdCMV gax entraîne une baisse de la viabilité cellulaire supérieure à 70%. Gax ayant été initialement décrit comme un gène d'arrêt de croissance, la demanderesse a observé de manière surprenante que l'arrêt de croissance est suivi par une mort cellulaire s'apparentant à l'apoptose.

15 La contrepartie in vivo de la mort cellulaire induite par la surexpression de Gax peut de manière avantageuse être associée à un bénéfice thérapeutique chez le patient cancéreux.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Utilisation de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
2. Utilisation d'au moins une séquence nucléique codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que la séquence nucléique est utilisé sous forme complexée avec du DEAE-dextran, avec des protéines récepteurs, ou avec des lipides ou polymères cationiques, sous forme de liposomes ou encore tel quel.
4. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que la séquence nucléique fait partie d'un vecteur viral recombinant.
- 15 5. Utilisation selon la revendication 4 caractérisée en ce que la séquence nucléique fait partie d'un vecteur viral, choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.
6. Utilisation selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un adénovirus, de préférence de type Ad 5 ou Ad 2.
- 20 7. Utilisation selon la revendication 4, 5 ou 6 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un adénovirus d'origine animale, de préférence canine.
8. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 7 caractérisée en ce que la séquence nucléique mise en oeuvre code pour tout ou partie de la protéine GAX de rat ou d'un variant de celle-ci.
- 25 9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que la séquence nucléique mise en oeuvre code pour la protéine GAX de rat ou son homologue humain.
10. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 9 caractérisée en ce que la séquence nucléique mise en oeuvre est un ADNc.

11. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 9 caractérisée en ce que la séquence nucléique mise en oeuvre est un ADNg.

5 12 . Utilisation selon l'une des revendications 4 à 11 caractérisée en ce que la séquence nucléique mise en oeuvre comprend des séquences permettant son expression dans la cellule infectée.

13. Utilisation selon l'une des revendications 4 à 12 caractérisée en ce que la séquence nucléique mise en oeuvre comprend une séquence signal dirigeant le polypeptide synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible.

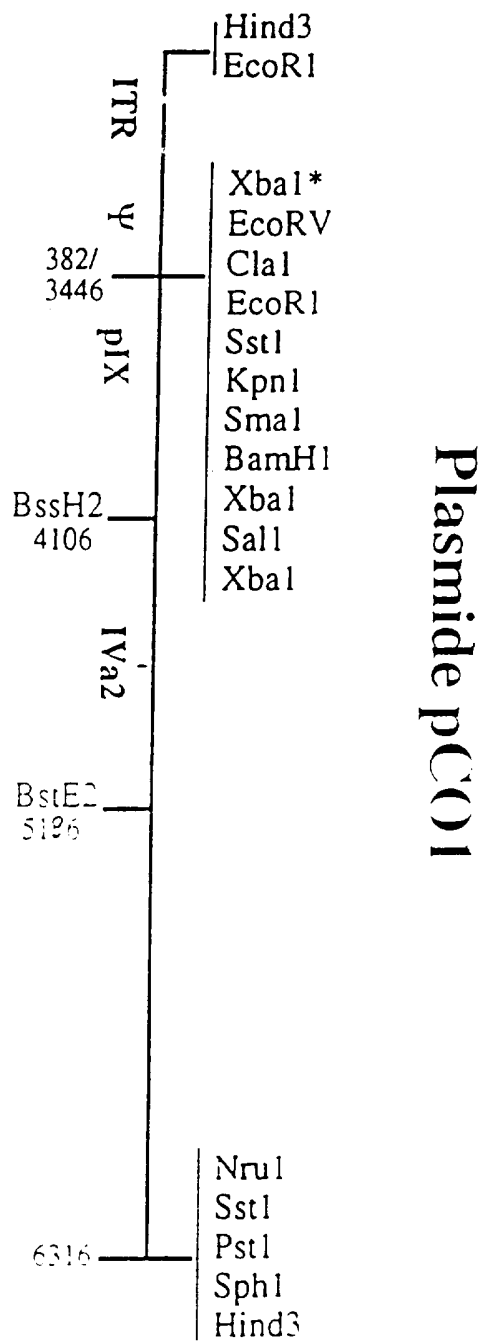


Figure 1

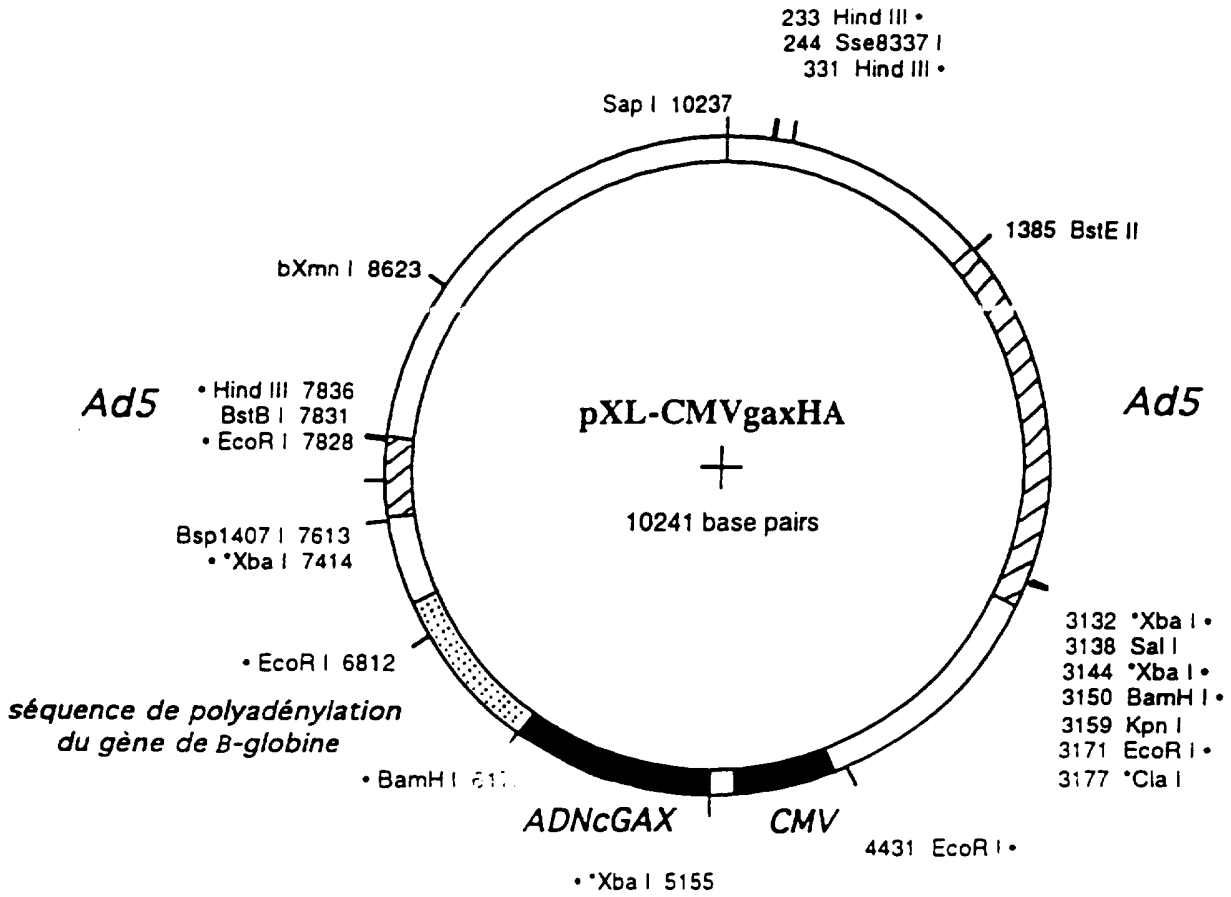


Figure 2

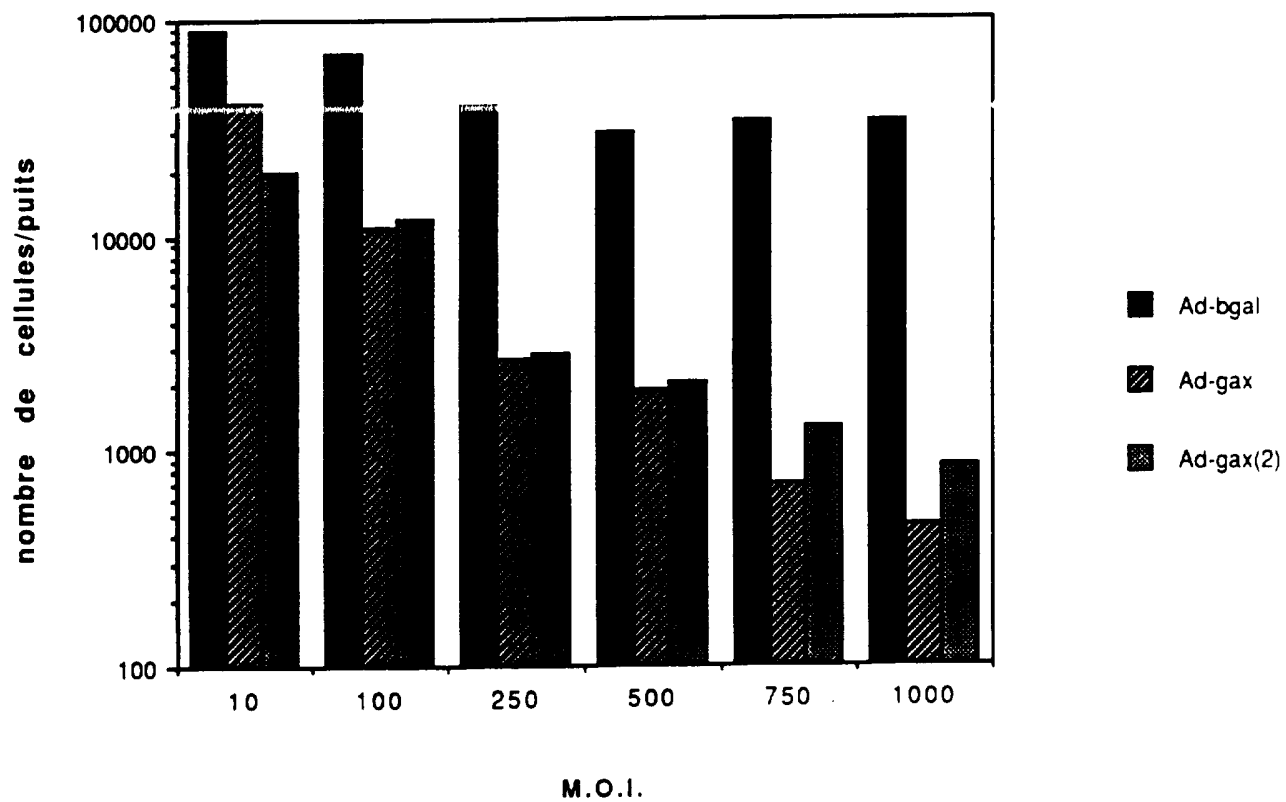


Figure 3

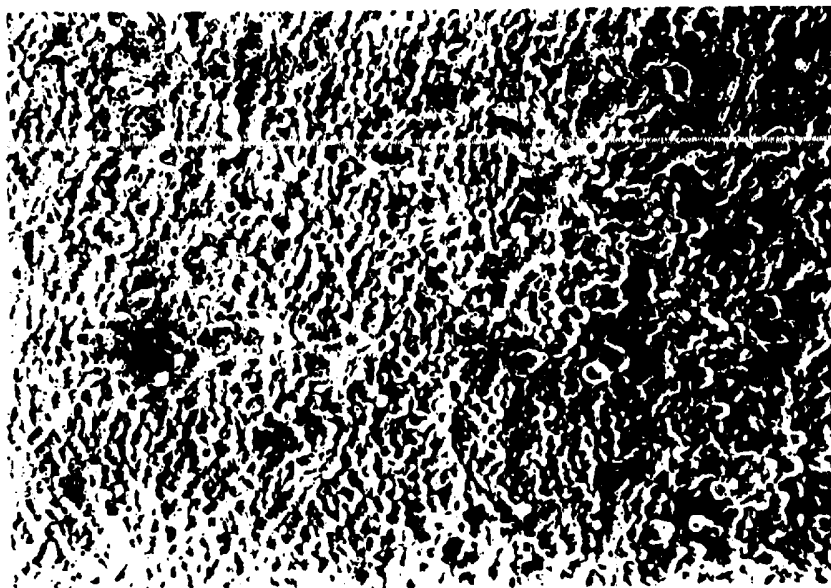


Figure 4A

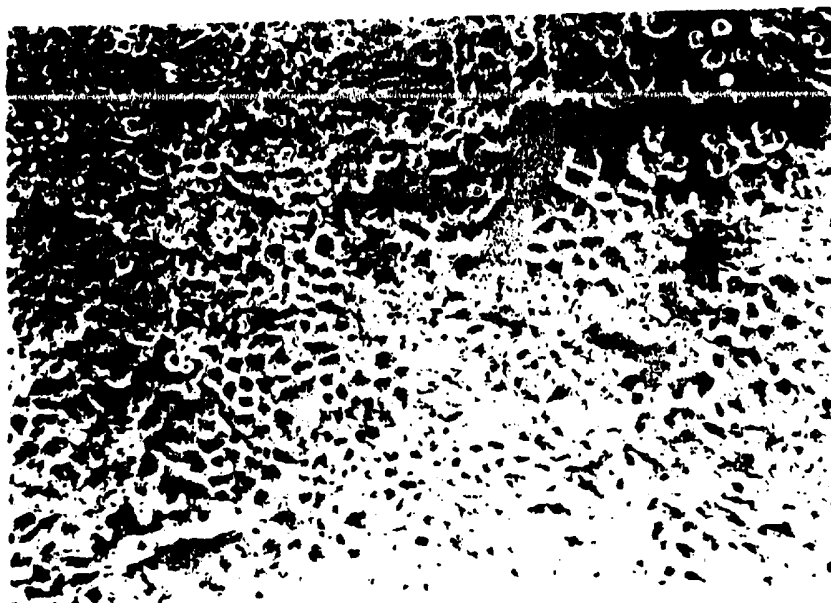


Figure 4B

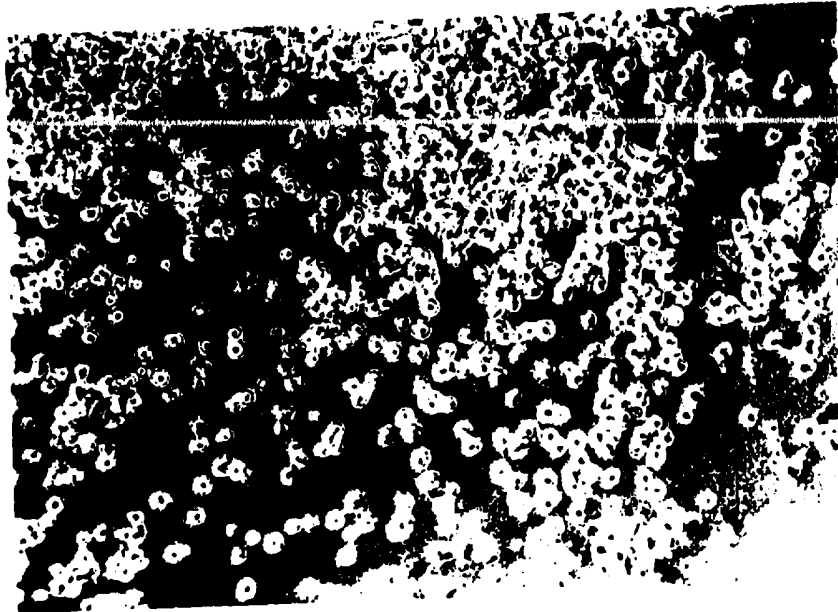


Figure 4C

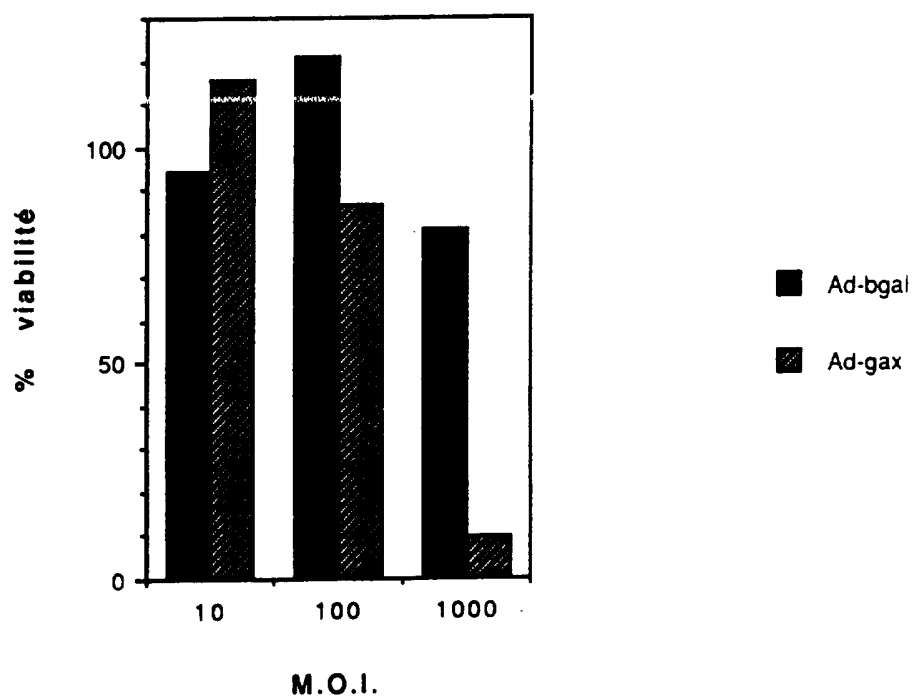


Figure 5

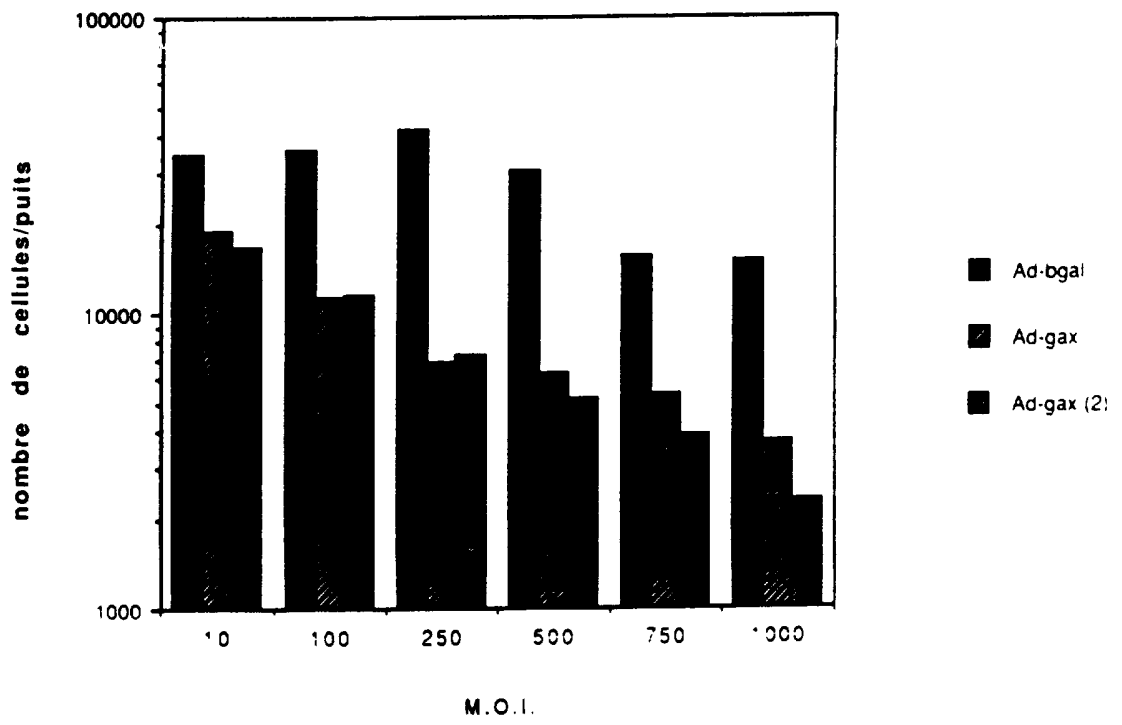


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/47 A61K38/17 A61K48/00 A61K31/70 //C12N15/12,
C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 23161 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 31 August 1995 see page 19, line 15 - page 21, line 22; claims; table 3 ---	1-13
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 6, June 1993, WASHINGTON, D.C., US, pages 3722-3733, XP000576016 D.H. GORSKI ET AL.: "MOLECULAR CLONING OF A DIVERGED HOMEBOX GENE THAT IS RAPIDLY DOWN-REGULATED DURING THE G0/G1 TRANSITION IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS." cited in the application see the whole document ---	1-13
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 1997

Date of mailing of the international search report

11. 03. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01690

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 10, 10 March 1995, MD US, pages 5457-5461, XP002008496 L. WEIR ET AL.: "EXPRESSION OF gax, A GROWTH ARREST HOMEBOX GENE, IS RAPIDLY DOWN-REGULATED IN THE RAT CAROTID ARTERY DURING THE PROLIFERATIVE RESPONSE TO BALLOON INJURY." cited in the application see the whole document ---</p>	1-13
A	<p>CELL, vol. 70, 21 August 1992, NA US, pages 595-607, XP002008497 G. DEL SAL ET AL.: "THE GROWTH ARREST-SPECIFIC GENE, gas1, IS INVOLVED IN GROWTH SUPPRESSION." see page 604, left-hand column, line 10 - line 40 ---</p>	1-13
A	<p>WO 94 26914 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 24 November 1994 cited in the application see page 1, line 7 - line 21; claims ---</p>	3-7
P,A	<p>WO 96 30385 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 3 October 1996 see the whole document -----</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01690

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9523161 A	31-08-95	AU 1966195 A	11-09-95
		CA 2183863 A	31-08-95
		EP 0754187 A	22-01-97

WO 9426914 A	24-11-94	FR 2705361 A	25-11-94
		AU 6787894 A	12-12-94
		BR 9406720 A	06-02-96
		CA 2163256 A	24-11-94
		CN 1124040 A	05-06-96
		CZ 9503028 A	14-02-96
		EP 0698108 A	28-02-96
		FI 955552 A	27-12-95
		HU 73465 A	28-08-96
		JP 8510122 T	29-10-96
		NO 954466 A	07-11-95
		PL 311660 A	04-03-96
		SK 144795 A	03-04-96
		ZA 9403358 A	16-01-95

WO 9630385 A	03-10-96	FR 2732357 A	04-10-96
		AU 5531596 A	16-10-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 'e Internationale No
PCT/FR 96/01690

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K14/47 A61K38/17 A61K48/00 A61K31/70 //C12N15/12,
C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 23161 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 31 Août 1995 voir page 19, ligne 15 - page 21, ligne 22; revendications; tableau 3 ---	1-13
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 6, Juin 1993, WASHINGTON, D.C., US, pages 3722-3733, XP000576016 D.H. GORSKI ET AL.: "MOLECULAR CLONING OF A DIVERGED HOMEBOX GENE THAT IS RAPIDLY DOWN-REGULATED DURING THE G0/G1 TRANSITION IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS." cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	1-13

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Février 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11. 03. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. 'e Internationale No
PCT/FR 96/01690

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 10, 10 Mars 1995, MD US, pages 5457-5461, XP002008496 L. WEIR ET AL.: "EXPRESSION OF gax, A GROWTH ARREST HOMEBOX GENE, IS RAPIDLY DOWN-REGULATED IN THE RAT CAROTID ARTERY DURING THE PROLIFERATIVE RESPONSE TO BALLOON INJURY." cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13
A	CELL, vol. 70, 21 Août 1992, NA US, pages 595-607, XP002008497 G. DEL SAL ET AL.: "THE GROWTH ARREST-SPECIFIC GENE, gas1, IS INVOLVED IN GROWTH SUPPRESSION." voir page 604, colonne de gauche, ligne 10 - ligne 40 ---	1-13
A	WO 94 26914 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 24 Novembre 1994 cité dans la demande voir page 1, ligne 7 - ligne 21; revendications ---	3-7
P,A	WO 96 30385 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 3 Octobre 1996 voir le document en entier -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem : Internationale No

PCT/FR 96/01690

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9523161 A	31-08-95	AU 1966195 A	11-09-95
		CA 2183863 A	31-08-95
		EP 0754187 A	22-01-97

WO 9426914 A	24-11-94	FR 2705361 A	25-11-94
		AU 6787894 A	12-12-94
		BR 9406720 A	06-02-96
		CA 2163256 A	24-11-94
		CN 1124040 A	05-06-96
		CZ 9503028 A	14-02-96
		EP 0698108 A	28-02-96
		FI 955552 A	27-12-95
		HU 73465 A	28-08-96
		JP 8510122 T	29-10-96
		NO 954466 A	07-11-95
		PL 311660 A	04-03-96
		SK 144795 A	03-04-96
		ZA 9403358 A	16-01-95

WO 9630385 A	03-10-96	FR 2732357 A	04-10-96
		AU 5531596 A	16-10-96
