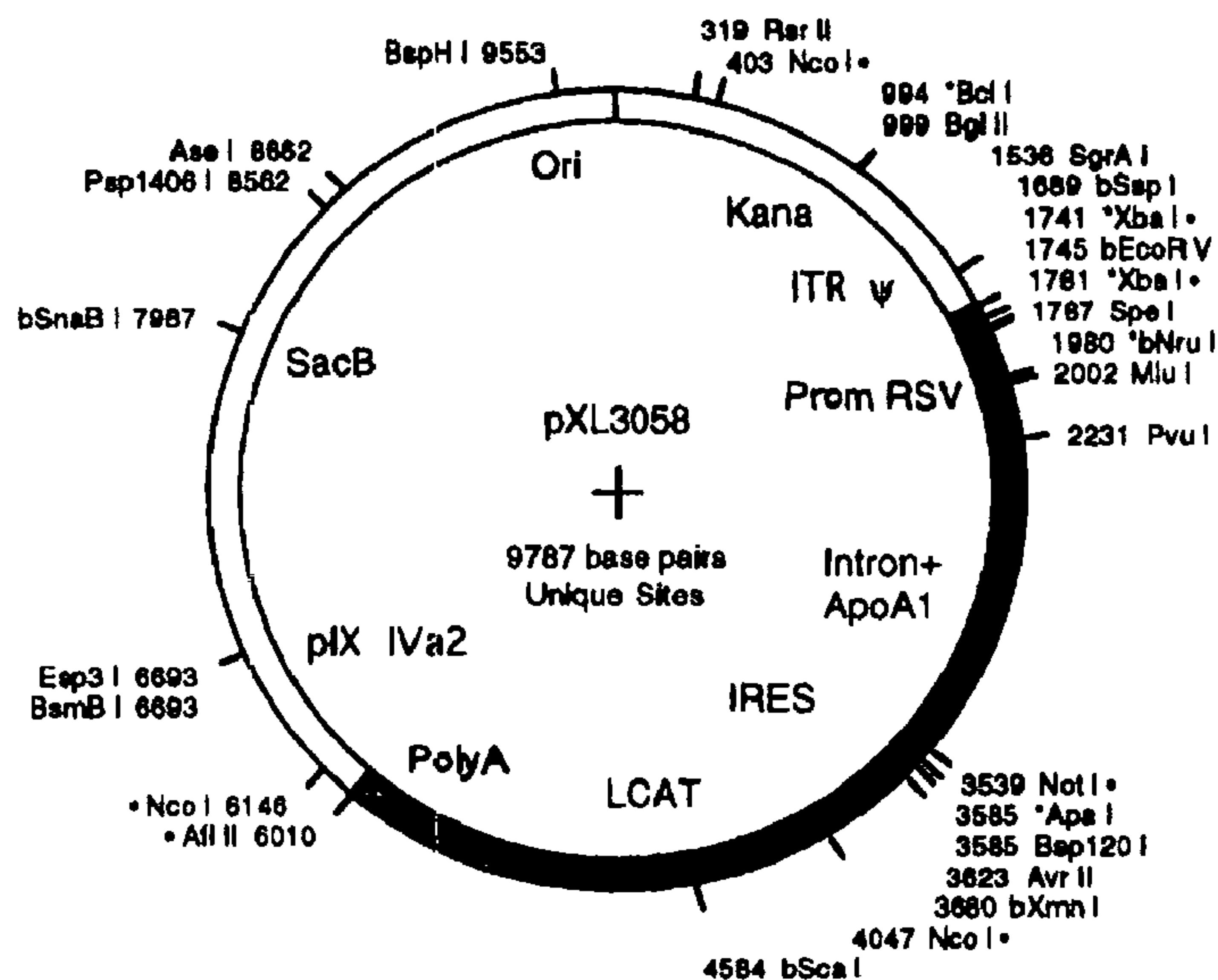




- (72) BENOIT, Patrick, FR  
(72) DUVERGER, Nicolas, FR  
(72) ROUY, Didier, FR  
(72) SEGURET, Sandrine, FR  
(71) RHONE-POULENC RORER S.A., FR  
(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/86, C07K 14/47, C12N 9/20, C12N 9/10, A61K 48/00  
(30) 1996/11/15 (9613969) FR  
(54) **ADENOVIRUS RECOMBINANTS BICISTRONNIQUES POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES AUX DYSLIPOPROTEINEMIES**  
(54) **RECOMBINANT BICISTRON ADENOVIRUS FOR TREATING PATHOLOGICAL CONDITIONS LINKED WITH DYSLIPOPROTEINEMIA**



(57) La présente invention concerne un virus recombinant défectif et de préférence un adénovirus caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, lesdits acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES. Elle se rapporte en outre à des constructions plasmidiques utiles pour préparer ces adénovirus, à des cellules transformées par ces plasmides ou adénovirus et à des compositions pharmaceutiques contenant lesdits adénovirus.

(57) The invention concerns a defective recombinant virus and preferably an adenovirus characterised in that it comprises at least two nucleic acids coding for distinct enzymes, proteins and/or co-factors involved in the reverse transfer of cholesterol, said nucleic acids being operationally bound to a transcriptional promoter and mutually separated by a sequence coding for an internal entry site of the IRES ribosome. The invention further concerns plasmid constructs useful for preparing these adenovirus, and cells transformed by these plasmids or adenovirus and pharmaceutical compositions containing said adenovirus.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

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

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 15/86, 9/10, A61K 48/00, C12N 9/20, C07K 14/47</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/22606</b> (43) Date de publication internationale: 28 mai 1998 (28.05.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02043 (22) Date de dépôt international: 13 novembre 1997 (13.11.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/13969 15 novembre 1996 (15.11.96) 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): BENOIT, Patrick [FR/FR]; 24, rue Jonquay, F-75014 Paris (FR). DUVERGER, Nicolas [FR/FR]; 1, rue Martel, F-75010 Paris (FR). ROUY, Didier [FR/FR]; 7, résidence Plein Sud, F-94320 Thiais (FR). SEURET, Sandrine [FR/FR]; 13, rue Charles Linné, F-78180 Montigny le Bretonneux (FR). (74) Mandataire: DERNONCOUR, Roxane; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), 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 Avec rapport de recherche internationale.</p>

(54) Title: RECOMBINANT BICISTRON ADENOVIRUS FOR TREATING PATHOLOGICAL CONDITIONS LINKED WITH DYS-LIPOPROTEINEMIA

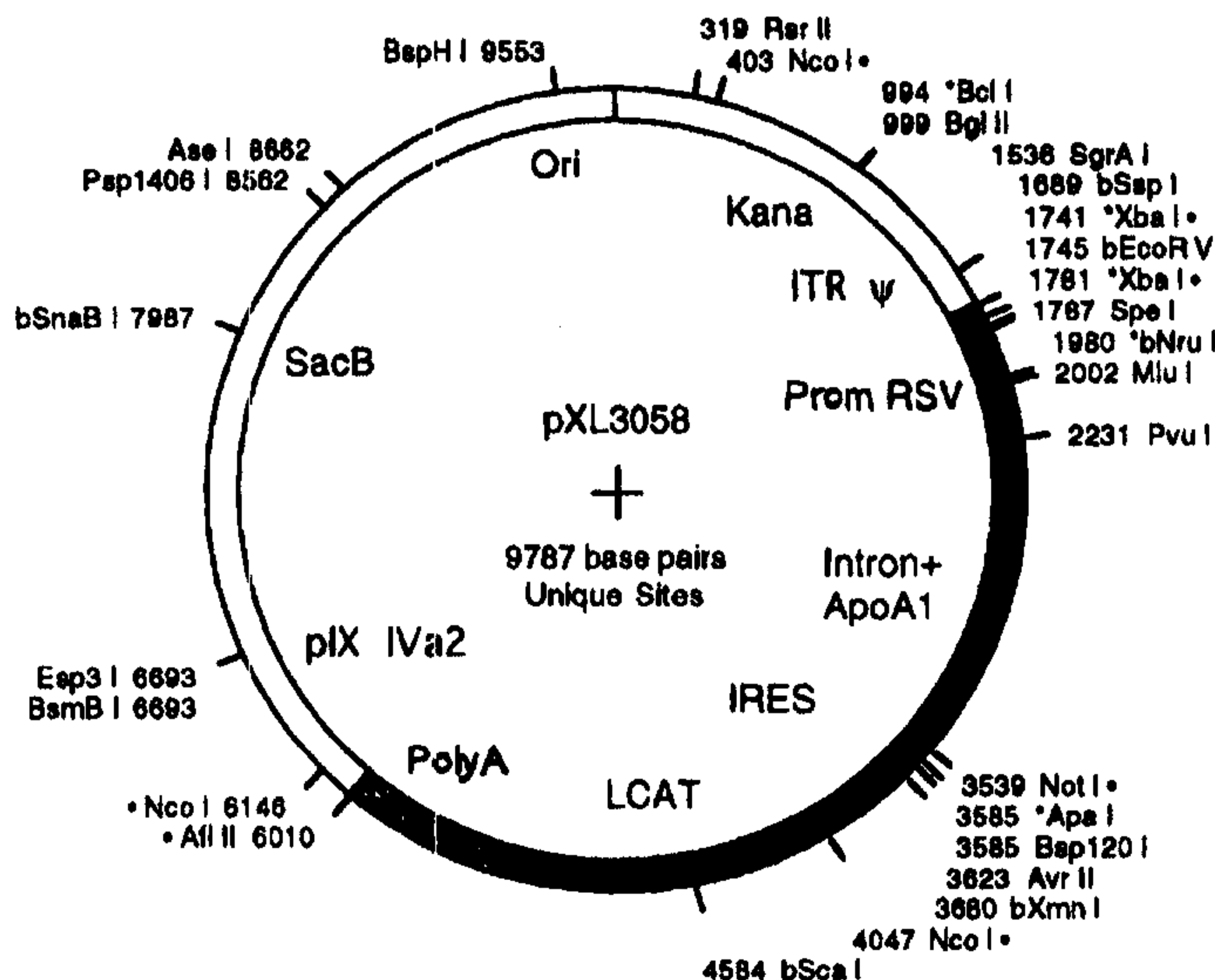
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS BICISTRONIQUES POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES AUX DYSLIPOPROTEINEMIES

## (57) Abstract

The invention concerns a defective recombinant virus and preferably an adenovirus characterised in that it comprises at least two nucleic acids coding for distinct enzymes, proteins and/or co-factors involved in the reverse transfer of cholesterol, said nucleic acids being operationally bound to a transcriptional promoter and mutually separated by a sequence coding for an internal entry site of the IRES ribosome. The invention further concerns plasmid constructs useful for preparing these adenovirus, and cells transformed by these plasmids or adenovirus and pharmaceutical compositions containing said adenovirus.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne un virus recombinant déficient et de préférence un adénovirus caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, lesdits acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES. Elle se rapporte en outre à des constructions plasmidiques utiles pour préparer ces adénovirus, à des cellules transformées par ces plasmides ou adénovirus et à des compositions pharmaceutiques contenant lesdits adénovirus.



**ADENOVIRUS RECOMBINANTS BICISTRONIQUES POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES AUX DYSLIPOPROTEINEMIES**

La présente invention concerne de nouveaux virus recombinants, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique, pour le transfert et l'expression in vivo de gènes  
5 désirés. Plus précisément, elle concerne des virus recombinants comprenant au moins deux gènes insérés et dont les produits d'expression interviennent au niveau du transport inverse du cholestérol. Elle se rapporte également des plasmides navettes utiles pour la production d'adénovirus conformes à l'invention. Plus particulièrement, la présente invention concerne des adénovirus recombinants défectifs et leur utilisation  
10 pour la prévention ou le traitement des pathologies liées aux dyslipoprotéinémies, qui sont connues pour leurs conséquences graves au niveau cardiovasculaire et neurologique.

Les dyslipoprotéinémies sont des désordres du métabolisme des lipoprotéines, responsables du transport, dans le sang et les fluides périphériques, de  
15 lipides comme le cholestérol et les triglycérides. Elles conduisent à des pathologies importantes, liées respectivement à l'hypercholestérolémie ou l'hypertriglycéridémie, telles que notamment l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une maladie complexe, polygénique, qui est définie sur le plan histologique par des dépôts (plaques lipidiques ou fibro-lipidiques) de lipides et  
20 d'autres dérivés sanguins dans la paroi des grosses artères (aorte, artères coronaires, carotide). Ces plaques, plus ou moins calcifiées selon l'avancement du processus, peuvent être jumelées à des lésions et sont liées à l'accumulation dans les artères de dépôts graisseux constitués essentiellement d'esters de cholestérol. Ces plaques s'accompagnent d'un épaissement de la paroi artérielle, avec hypertrophie du muscle  
25 lisse, apparition de cellules spumeuses et accumulation de tissu fibreux. La plaque athéromateuse est très nettement en relief sur la paroi, ce qui lui confère un caractère sténosant responsable des occlusions vasculaires par athérome, thrombose ou embolie qui surviennent chez les patients les plus atteints.

Les hypercholestérolémies peuvent donc conduire à des pathologies cardio-vasculaires

très graves telles que l'infarctus, la mort subite, la décompensation cardiaque, les accidents cérébro-vasculaires, etc.

Il est donc particulièrement important de pouvoir disposer de traitements permettant de diminuer dans certaines situations pathologiques les taux de cholestérol plasmatique voire de stimuler l'efflux de cholestérol (transport inverse du cholestérol) au niveau des tissus périphériques afin de décharger les cellules ayant accumulé du cholestérol dans le contexte de la formation d'une plaque d'athérome. Le cholestérol est véhiculé dans le sang par diverses lipoprotéines dont les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Les LDL sont synthétisées au niveau du foie et permettent d'approvisionner les tissus périphériques en cholestérol. Au contraire, les HDL captent le cholestérol au niveau des tissus périphériques et le transportent vers le foie où il est stocké et/ou dégradé.

Parmi les dyslipémies les plus courantes figurent celles caractérisées par un taux du cholestérol LDL (lipoprotéine de faible densité) élevé et l'hypoalphalipoprotéïnémie. Cette dernière se caractérise par un taux du cholestérol HDL (lipoprotéine de haute densité) inférieur à 35 mg/dl et elle représente 40% des cas des dyslipémies (Genest et al.,1992). L'hypoalphalipoprotéïnémie semble liée à une déficience génétique d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la synthèse, la maturation et le catabolisme des particules HDL et a souvent pour conséquence l'apparition prématurée de maladies cardiovasculaires (Dammermann et al., 1995). D'une façon générale, il existe une corrélation inverse entre l'incidence de ces dernières et le taux des particules HDL (Miller et al.,1987).

L'effet protecteur des HDL contre les maladies cardiovasculaires a été démontré par des expériences de transfert de gène in vivo sur les souches de souris susceptibles de développer les lésions athéroscléreuses et chez lesquelles l'augmentation du nombre de particules HDL inhibe le développement de ces lésions (Rubin et al.,1991; Plump et al.,1994). Il a été proposé que l'effet protecteur des particules HDL soit dû à leur rôle dans le transport inverse du cholestérol (Reiche et al,1989). Le transport inverse est le processus par lequel le cholestérol en excès est

transféré des tissus périphériques vers le foie pour son élimination (figure 1). Il est composé d'une série d'étapes comprenant la prise en charge et l'estérification du cholestérol sur les particules HDL ainsi que son transfert sur les particules lipoprotéiques de faible densité qui sont recaptées ultérieurement par le foie et ce processus implique bien entendu la mise en oeuvre d'un certain nombre de protéines comme la CETP, d'enzymes dont la cholestérol acyltransférase et la lipase hépatique et/ou leurs co-facteurs comme les apolipoprotéines AI et AIV.

Alors qu'il existe des traitements efficaces pour diminuer le taux du cholestérol LDL et des triglycérides fondés sur des médicaments hypolipidémiques et antihypertensifs, les soins actuels de l'hypoalphalipoprotéinémie n'offrent qu'une efficacité limitée.

La présente invention s'intéresse précisément au traitement, par thérapie génique, des pathologies liées à l'hypoalphalipoprotéinémie.

L'approche thérapeutique retenue par la présente invention vise à augmenter la cinétique du transport inverse du cholestérol afin d'induire la régression des lésions athéroscléreuses ou bien de prévenir leur formation. Avantageusement cet objectif est atteint selon l'invention via une expression simultanée et efficace, dans les cellules à traiter, d'au moins deux des protéines, enzymes ou co-facteurs intervenant au niveau du transport inverse du cholestérol.

Au sens de l'invention, une protéine, enzyme et/ou l'un de leur co-facteur est considéré comme étant impliqué dans le transport inverse du cholestérol dans la mesure où toute perturbation au niveau de sa concentration cellulaire, affecte automatiquement le processus inverse du cholestérol.

A titre représentatif des enzymes concernées on peut plus particulièrement citer la lécithine cholestérol acyltransférase et la lipase hépatique.

La lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) est une glycoprotéine de 67 kDa, synthétisée par le foie, qui catalyse le transfert d'un groupement acyl de la lécithine au cholestérol en produisant de la lysophosphatidylcholine et des esters de

cholestérol (Glomset, 1968). Le cofacteur de cette enzyme est l'apolipoprotéine AI qui est liée à la surface des particules HDL. En maintenant le gradient de concentration en cholestérol entre les cellules périphériques et les HDL, elle joue un rôle principal dans la première étape du transport inverse du cholestérol .

5           La lipase hépatique (LH) humaine est une glycoprotéine de 66 kDa aux activités triglycéride hydrolase et phospholipase, synthétisée et sécrétée par les hépatocytes. Liée à la surface des cellules hépatiques, via les protéoglycanes héparine sulfate, elle participe au métabolisme des chylomicrons, des IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire) et des HDL. La LH a une affinité particulière pour les grosses  
10           particules HDL dont elle dégrade les phospholipides et les triglycérides en générant des particules discoidales de HDL qui ont la propriété d'accepter le cholestérol cellulaire. La déficience en LH chez l'homme se caractérise par une quantité élevée de LDL riches en triglycérides, des grosses particules HDL et le développement précoce de l'athérosclérose (Hegele et al.,1993).

15           En ce qui concerne les protéines, il s'agit au sens de l'invention plus préférentiellement de la protéine de transfert des esters du cholestérol (CETP), des apolipoprotéines AI et AIV ou de l'un de leur variants.

          La protéine de transfert des esters du cholestérol (CETP) est une glycoprotéine de 74 kDa synthétisée dans le tissu adipeux et le foie. Dans le plasma, elle est  
20           principalement associée aux HDL. C'est là qu'elle catalyse le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines de faible densité. Ce transfert est suivi du passage des triglycérides des lipoprotéines de faible densité jusqu'aux HDL. La surexpression de la CETP chez les souris transgéniques hypertriglycémidiques inhibe le développement des lésions athéroscléreuses (Hayek et al.,1995). Cette expérience  
25           est en accord avec l'observation, chez les individus déficients en CETP, d'un développement précoce de maladies cardiovasculaires (Zhong et al.,1996).

          L'apolipoprotéine AI est une protéine constituée de 243 acides aminés, synthétisée sous la forme d'une prépropeptide de 267 résidus, ayant une masse moléculaire de 28.000 daltons. Elle est synthétisée chez l'homme spécifiquement dans

le foie et l'intestin et elle constitue la protéine essentielle des particules HDL (70% de leur masse en protéines). Elle est abondante dans le plasma (1.0-1.2 g/l). Son activité la mieux caractérisée sur le plan biochimique est l'activation de la lécithine-cholestérol acyl-transférase (LCAT), mais de nombreuses autres activités lui sont attribuées, comme notamment la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire. L'apolipoprotéine AI joue un rôle majeur dans la résistance à l'athérosclérose lié au transport inverse du cholestérol. Son gène, long de 1863 bp, a été cloné et séquencé (Sharpe et al., *Nucleic Acids Res.* 12(9) (1984) 3917). Parmi les produits protéiques à activité de type apolipoprotéine AI, on peut citer notamment les variants naturels décrits dans l'art antérieur.

L'apolipoprotéine AIV (apoAIV) est une protéine constituée de 376 acides aminés, synthétisée spécifiquement dans l'intestin sous la forme d'un précurseur de 396 résidu. En ce qui concerne son activité physiologique, on sait qu'elle peut activer in vitro la lécithin-cholestérol-acyltransférase (LCAT) (Steinmetz et Coll., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260 : 2258-2264) et qu'elle peut, comme l'apolipoprotéine AI, interférer avec la fixation des particules de HDL sur les cellules endothéliales aortiques bovines (Savion et Coll., 1987, *Eur. J. Biochem.*, 257 : 4171-4178). Ces deux activités indiquent que l'apoAIV intervient très vraisemblablement comme médiateur du transport inverse du cholestérol. Le gène de l'apoAIV a été cloné et décrit dans l'art antérieur (voir notamment WO 92/05253). Parmi les produits protéiques à activité de type apolipoprotéine AIV, on peut citer notamment les fragments et dérivés décrits dans la demande de brevet FR 92 00806.

Plus précisément, la présente invention repose sur l'utilisation de virus recombinants qui permettent de transférer et d'exprimer au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs impliqués dans le transport inverse du cholestérol.

De manière inattendue, la demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il était possible d'assurer efficacement le transfert et l'expression d'au moins deux acides nucléiques à partir d'un même virus recombinant, en intégrant ces acides nucléiques

dans ledit virus sous la forme d'une unité bicistronique. Il est clair que l'emploi d'un unique virus et non de deux présente de nombreux intérêts sur le plan thérapeutique.

Tout d'abord, il est plus avantageux de construire un unique virus recombinant incorporant les deux gènes que deux virus recombinant respectifs.

5 De même, la mise en oeuvre sur le plan thérapeutique d'un vecteur tel que revendiqué permet de réduire de moitié les quantités en virus recombinants nécessaires à l'expression desdits gènes. Ceci est tout particulièrement bénéfique au regard de la réponse immunitaire classiquement manifestée à l'égard des cellules infectées par des virus recombinants. Cette réponse immunitaire se traduit  
10 ordinairement par une destruction des cellules infectées et/ou une réponse inflammatoire importante. Il est clair que ces deux manifestations sont fortement préjudiciables au niveau de la durée d'expression des gènes thérapeutiques et donc de l'effet thérapeutique attendu.

Enfin, un transfert efficace et à concentration égale de deux virus  
15 recombinants distincts est un événement incertain et qui donc nécessite d'être contrôlé par des manipulations supplémentaires. Dans le cas de la mise en oeuvre d'un virus recombinant selon l'invention, on peut avantageusement s'affranchir de ce type de contrôle.

Avantageusement, les virus revendiqués sont capables de transférer et  
20 d'exprimer efficacement, pour une durée importante et sans effet cytopathologique, deux acides nucléiques codant pour des protéines, enzymes et/ou cofacteurs impliqués dans le transport inverse du cholestérol.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un virus recombinant défectif comprenant au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes,  
25 protéines et/ou co-facteurs, distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, lesdits acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

Les acides nucléiques sont de préférence choisis parmi les gènes codant pour tout ou partie de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), la protéine de transfert des esters du cholestérol (CETP), la lipase hépatique (LH), les apolipoprotéines AI et AIV ou l'un de leurs variants.

5 Les acides nucléiques insérés peuvent être des fragments d'ADN complémentaire (ADNc), d'ADN génomique (ADNg), ou des constructions hybrides consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Comme indiqué ci-avant, il peut s'agir d'un gène codant pour tout ou partie d'une des  
10 enzymes, protéines et/ou co-facteurs impliqués dans le transport inverse du cholestérol ou d'un variant de celles-ci. Au sens de l'invention, le terme variant désigne tout mutant, fragment ou peptide possédant au moins une propriété biologique du produit protéique considéré, ainsi que, le cas échéant, leurs variants naturels respectifs.

15 Ces fragments et variants peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par modifications génétique et/ou chimique et/ou enzymatique. Les modifications génétiques incluent les suppressions, délétions, mutations, etc.

20 Les acides nucléiques insérés au sens de l'invention sont préférentiellement les gènes codant pour tout ou partie des enzymes, protéines et/ou cofacteurs correspondants humains. Il s'agit plus préférentiellement d'ADNc ou d'ADNg.

25 Chaque acide nucléique inséré peut également comprendre des séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, il 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 sa séquence signal naturelle, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les virus recombinants revendiqués comprennent au moins un acide nucléique codant pour la LCAT. Plus préférentiellement, le second acide nucléique inséré code pour la LH, la CETP ou l'ApoAI.

5 Comme explicité précédemment, la co-expression des deux acides nucléiques considérés est assurée via préliminairement la formation d'un ARN unique qui est ensuite traduit pour conduire aux deux enzymes respectives. A ces fins, le virus recombinant incorpore outre les deux séquences d'acides nucléiques, au moins un promoteur transcriptionnel, un site de polyadénylation et une séquence  
10 IRES.

Ce promoteur transcriptionnel est lié opérationnellement aux acides nucléiques codant de manière à produire l'ARNm bicistronique et à conduire l'expression des deux enzymes respectives à partir dudit ARNm. Selon un mode préféré de l'invention, il est placé directement en amont du premier acide nucléique.

15 Ce promoteur transcriptionnel peut notamment être choisi parmi les séquences qui sont naturellement responsables de l'expression dudit acide nucléique vis à vis duquel il est placé en amont sous réserve bien sûr que ces séquences soient 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 séquences d'acides  
20 nucléiques 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 génome d'un virus, et notamment, les promoteurs des  
25 gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, MT-1, SV40 etc. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine,  $\alpha$ -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 (pyruvate kinase, villine, promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides gras, promoteur de l'actine  $\alpha$  des cellules du muscle lisse, promoteurs spécifiques pour le foie ; Apo AI, Apo AII, Albumine humaine etc) 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

En ce qui concerne la séquence IRES, elle dérive de préférence d'un picornavirus. Plus précisément, cette séquence IRES de picornavirus est issue soit du virus encéphalomyocarditis soit du poliovirus. Il s'agit plus préférentiellement du fragment issu de l'encephalomyocarditis présent dans le vecteur pCITE-2a+ de NOVAGEN.

A des fins de clarté de langage, la construction définie par le promoteur transcriptionnel, les deux acides nucléiques, le site de polyadénylation et la séquence IRES présente entre les deux acides nucléiques, sera identifiée ci-après sous la dénomination cassette bicistronique.

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 réplication 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 la cassette bicistronique définie ci-dessus. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Le virus selon l'invention peut être dérivé d'un adénovirus, d'un virus adéno-associé (AAV) ou d'un rétrovirus. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un adénovirus.

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.

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 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 (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 au moins une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E3. Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5. Selon un autre mode de réalisation préféré, la cassette bicistronique est insérée au niveau de la délétion dans la région E1.

Un mode particulier de la présente invention concerne donc un adénovirus recombinant déficient caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, lesdits acides nucléiques étant liés

opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

A titre d'adénovirus recombinants préférés selon l'invention on citera plus particulièrement les adénovirus recombinants défectifs comprenant au moins un acide nucléique codant pour la LCAT et un acide nucléique codant soit pour la LH, la CETP ou l'ApoAI, lesdits acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

A titre représentatif de ces adénovirus on peut notamment faire mention de celui représenté en figure 2, contenant les gènes codant respectivement pour la LCAT et la CETP et issu de la recombinaison homologue entre le pXL 2974 et le pXL2822.

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 préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la cassette bicistronique. 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 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, comme illustré dans les exemples.

Toutefois, selon un mode privilégié de l'invention, les adénovirus revendiqués sont préparés selon un procédé original décrit dans la demande de brevet WO96/25506 qui met en oeuvre à titre de plasmide navette, un plasmide procaryote comprenant un génome d'adénovirus recombinant bordé par un ou plusieurs sites de restriction non présent(s) dans ledit génome. Ce protocole est notamment illustré en figure 2. Ce procédé est particulièrement intéressant puisqu'il permet de s'affranchir de l'emploi d'une deuxième construction apportant une autre partie du génome viral, et de l'étape de recombinaison dans la lignée de transcomplémentation.

Un second objet de la présente invention porte précisément sur des plasmides procaryotes particuliers mis en oeuvre pour la production des adénovirus revendiqués.

Selon un mode préféré de l'invention, ces plasmides procaryotes intègrent la cassette bicistronique précédemment décrite.

Plus précisément, la présente invention a également pour objet un plasmide procaryote comprenant un génome d'adénovirus et au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, les deux acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome, IRES.

De manière préférentielle, les plasmides procaryotes selon l'invention comprennent une première région permettant la répllication dans les cellules procaryotes et une deuxième région comportant le génome adénoviral bordé d'un ou plusieurs sites de restriction non présent(s) dans ledit génome et dans laquelle sont présents au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, ces deux acides nucléiques étant liées opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome, IRES.

En ce qui concerne les définitions des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, le promoteur transcriptionnel, le site de polyadénylation et la séquence IRES de même en ce qui touche leur organisation au sein de ladite cassette on se rapportera à ce qui a été décrit précédemment.

La région permettant la répllication dans les cellules procaryotes, utilisée dans les plasmides revendiqués, peut être toute origine de répllication fonctionnelle dans les cellules choisies. Il peut s'agir d'une origine de répllication issue d'un plasmide du groupe d'incompatibilité P (exemple = pRK290) qui permet la répllication dans les souches d'E. coli pol A. Plus généralement, il peut s'agir de toute origine de répllication issue d'un plasmide se répliquant dans les cellules procaryotes. Ce plasmide peut être un dérivé de RK2, de pBR322 (Bolivar et al., 1977), un dérivé de pUC (Viera et Messing, 1982), ou d'autres plasmides dérivant du même groupe d'incompatibilité, c'est à dire de ColE1 ou de pMB1 par exemple. Ces plasmides peuvent être choisis par ailleurs dans d'autres groupes d'incompatibilité se répliquant chez Escherichia coli. Il peut s'agir de plasmides dérivés de plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité A, B, FI, FII, FIII, FIV, H1, H11, I1, I2, J, K, L, N, OF, P, Q, T, U, W, X, Y, Z ou 9 par exemple. D'autres plasmides peuvent encore être utilisés, parmi lesquels des plasmides ne se répliquant pas chez E. coli mais chez d'autres hôtes tels que B. subtilis, Streptomyces, P. putida, P. aeruginosa, Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens, Staphylococcus aureus, Streptomyces pristinaespiralis, Enterococcus faecium ou Clostridium. A titre préférentiel, on utilise les origines de répllication issues de plasmides se répliquant chez E. coli.

Comme indiqué précédemment, le génome adénoviral présent dans les plasmides de l'invention est avantageusement un génome complet ou fonctionnel, c'est-à-dire ne nécessitant pas l'apport d'autres régions, par recombinaison ou ligature, pour la production des stocks viraux dans les lignées d'encapsidation choisies.

Préférentiellement, le génome adénoviral recombinant comprend au moins des séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation. Dans un mode de

réalisation préféré de l'invention, ce génome de l'adénovirus utilisé est dépourvu de tout ou partie de la région E1. Avantageusement, le génome de l'adénovirus utilisé est dépourvu d'une partie de la région E1 comprise entre les nucléotides 454 à 3328 (fragment PvuII-BglII) ou 382 à 3446 (fragment HinfII-Sau3A).

5 Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le génome de l'adénovirus utilisé est également dépourvu de tout ou partie de la région E3 et/ou E4. Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, il s'agit d'un génome d'adénovirus dépourvu en régions E1 et E3.

10 Plus précisément, les plasmides procaryotes revendiqués comprennent en orientation 5'-3' au moins une origine de répllication fonctionnelle dans les cellules procaryotes, une première partie d'un génome adénoviral comprenant les séquences virales ITR  $\psi$ , un promoteur transcriptionnel, un premier acide nucléique codant pour une enzyme, protéine et/ou un co-facteur impliqué dans le transport inverse du cholestérol, une séquence IRES, un second acide nucléique codant pour une seconde  
15 enzyme, protéine et/ou un co-facteur impliqué dans le transport inverse du cholestérol, un site de polyadénylation et une second partie d'un génome adénoviral comprenant la région pIX-IVA2.

Avantageusement, les plasmides procaryotes revendiqués selon l'invention comprennent également une région permettant la sélection des cellules procaryotes  
20 contenant ledit plasmide. Cette région peut être constituée notamment par tout gène conférant la résistance à un produit, et notamment à un antibiotique. Ainsi, on peut citer les séquences d'acides nucléiques conférant une résistance à la kanamycine (Kan<sup>r</sup>), à l'ampicilline (Amp<sup>r</sup>), à la tétracycline (tet<sup>r</sup>) ou à la spectinomycine, par exemple, qui sont couramment utilisés en biologie moléculaire (Maniatis et al.,  
25 1989). La sélection de plasmides peut se faire par d'autres séquences d'acides nucléiques que des gènes codant pour des marqueurs de résistance à un antibiotique. D'une manière générale, il s'agit d'un gène qui donne à la bactérie une fonction qu'elle ne possède plus (cela peut correspondre à un gène qui a été délété sur le chromosome ou rendu inactif), le gène sur le plasmide rétablissant cette fonction. A titre

d'exemple il peut s'agir d'un gène d'un ARN de transfert qui rétablit une fonction chromosomique déficiente (Somoes et al., 1991).

Selon un mode préféré, le plasmide procaryote revendiqué comprend au moins un acide nucléique codant pour la LCAT, le second acide nucléique étant  
5 choisi parmi ceux codant pour la CETP, la LH ou l'ApoAI.

A titre représentatif de ces plasmides procaryotes on peut notamment citer le plasmides pXL2974 et pXL3058, représentés respectivement en figure 4 et 6. Le plasmide pXL2974 comprend en orientation 5'-3', une origine de répllication, un gène de résistance à la spectinomycine, le gène Sac B de sensibilité au sucrose. les  
10 séquences virales ITR  $\psi$ , le promoteur RSV, les deux transgènes LCAT et CETP séparés par l'IRES, le site de polyadénylation et les séquences virales pIX et IVA2. Le plasmide pXL3058 comprend en orientation 5'-3', une origine de répllication, un gène de résistance à la kanamycine, les séquences virales ITR  $\psi$ , le promoteur RSV, les deux transgènes LCAT et intron+ApoAI séparés par l'IRES, le site de  
15 polyadénylation. les séquences virales pIX et IVA2 et le gène Sac B de sensibilité au sucrose.

La présente invention s'étend également aux constructions plasmidiques mises en oeuvre pour la construction de ces plasmides procaryotes et qui comprennent également la cassette bicistronique définie selon l'invention.

20 Les plasmides procaryotes revendiqués selon l'invention peuvent notamment être obtenus par transformation d'un plasmide navette initial comportant la cassette bicistronique définie selon l'invention à savoir comprenant la séquence codant pour un promoteur transcriptionnel lié opérationnellement à deux acides nucléiques codant pour deux enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts impliqués dans le transport  
25 inverse du cholestérol, un site de polyadénylation et une séquence IRES située entre lesdits acides nucléiques.

A titre représentatif de ces plasmides navettes, on peut notamment citer les plasmides pXL2970 et pXL2984 décrits respectivement en figures 3 et 5.

En ce qui concerne les définitions des enzymes impliquées dans le transport inverse du cholestérol, le promoteur transcriptionnel et la séquence IRES de même en ce qui touche leur organisation au sein de ladite cassette on se rapportera à ce qui a été décrit précédemment.

5 Un autre objet de la présente demande concerne toute cellule procaryote contenant un plasmide procaryote tel que défini ci-avant. Il peut s'agir en particulier de toute bactérie pour laquelle il existe un système de vecteur où l'ADN recombinant peut être introduit. Citons par exemple Escherichia coli, Salmonella typhimurium,  
10 Bacillus subtilis, Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, Agrobacterium tumefaciens, Rhizobium meliloti ou les bactéries du genre Streptomyces. Ces cellules sont obtenues avantageusement par transformation selon les techniques connues de l'homme du métier.

Elle vise également l'utilisation d'un virus recombinant, d'un adénovirus recombinant défectif ou d'une construction plasmidique navette tels que définis ci-  
15 dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des pathologies liées à l'hypoalphalipoprotéïnémie dont plus particulièrement l'athérosclérose et/ou la resténose.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs virus recombinants défectifs dont adénovirus tels que  
20 décrits précédemment. De telles compositions peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, la composition selon l'invention contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en  
25 particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), 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.

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, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon  
5 l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml.. 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  
10 documentées dans la littérature.

La présente invention offre un nouveau moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des pathologies liées à l'hypoalphalipoprotéinémie, en particulier dans le domaine des affections cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'angor, la mort subite, la décompensation cardiaque, les accidents  
15 cérébro-vasculaires, l'athérosclérose ou la resténose.

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  
20 qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

#### **LEGENDE DES FIGURES**

Figure 1: Représentation schématique du mécanisme présumé du transport inverse du cholestérol.

25 Figure 2: Représentation du protocole de production d'adénovirus par recombinaison homologue dans E. Coli.

Figure 3: Protocole de construction du plasmide navette bicistronique pXL 2970 comprenant RSV-LCAT-IRES-CETP.

Figure 4: Protocole de construction du plasmide procaryote pXL2974 comprenant RSV-LCAT-IRES-CETP.

Figure 5: Protocole de construction du plasmide pXL2984 comprenant RSV-LCAT-IRES-LH.

5 Figure 6: Représentation du plasmide procaryote pXL3058 comprenant RSV-ApoAI-IRES-LCAT.

## I MATERIELS ET METHODES

### 10 I-1 MATERIELS

1) Les plasmides utilisés pour la construction des adénovirus recombinants bicistroniques LCAT-IRES-CETP, LCAT-IRES-LH et LCAT-IRES-ApoAI sont :

- pSK IRES (commercialisé par NOVAGEN)
- 15 -pXL 2616 ADNc LCAT Séguret-Macé et al. Circulation 1996, 94 (9):2177-2184
- pCRII (commercialisé par INVITROGEN)
- pXL 2794 ( WO96/25506)
- pXL 2757 ( WO96/25506)

20 2) Les ARN totaux provenant des hépatocytes et des cellules HepG2

3) Les cellules 293, cellules de rein humaines, contenant le gène codant pour la protéine E1 adénovirale (Graham et al.,1977)

4) Les bactéries Escherichia coli: sous-type DH5 $\alpha$  de génotype EndA1,recA1,hsd R17, supE44,I-,thy-1,gyrA,rel A1,lacZD M15,deoR<sup>+</sup>, F<sup>+</sup>,dam<sup>+</sup>,dcm<sup>+</sup> (Woodcock et  
25 al.,1989)

5) Les enzymes et les tampons de restriction sont fournis par New England Biolabs

### I-2 METHODES

### 30 TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les 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 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 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.

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 ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse 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 [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

## **TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE**

### **a) Culture des cellules**

Les cellules 293 sont cultivées sur milieu d'Eagle (MEM, Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF, Gibco BRL) à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 10 **b) Transfection des cellules en culture**

Les cellules 293 cultivées dans les boîtes de 100 mm sur milieu MEM et supplémentées avec 10% de sérum de veau foetal sont transfectées avec 1 µg d'ADN par la lipofectamine (Gibco BRL). Six heures plus tard, le milieu est enlevé et les cellules sont incubées en milieu complet (MEM + 10% SVF). Les surnageants de culture de cellules transfectées par les plasmides recombinants RSV LCAT-IRES-CETP, RSV LCAT-IRES-ApoAI et RSV LCAT-IRES-LH ainsi que les contrôles β-galactosidase et le surnageant des cellules non transfectées ont été recueillis 72h après transfection et conservés à 4°C. Les tests d'activité des enzymes LCAT, CETP, ApoAI et LH sont effectués sur des fractions de 10 à 30 µl de surnageant de cellules en utilisant le plasma humain comme témoin.

20

### **c) Production et purification des adénovirus recombinants**

L'ADN adénoviral bicistronique est obtenu par recombinaison homologue dans *e. coli*. Par la suite, il est linéarisé par PacI et le virus produit après transfection des cellules 293. Les cellules 293, transcomplémentantes pour la protéine E1, sont transfectées, par la lipofectamine, avec 10µg d'ADN adénoviral linéarisé. Après

25

recouvrement par agar des cellules 293 dans le milieu MEM supplémenté avec 4% du SVF et l'incubation de 8 jours à 37°C, les plages contenant le virus recombinant sont prélevées et leur profil de restriction analysé.

d) Infection des cellules en culture

- 5 L'infection par 0.25 , 0.5 et 1ml de surnageant contenant l'adénovirus recombinant bicistronique est réalisée sur une plaque de 12 puits contenant approximativement  $4 \cdot 10^5$  cellules 293. Après incubation de 72<sup>h</sup> en 2 ml du MEM supplémenté avec 2% de SVF, le surnageant des cellules infectées est prélevé et les activités enzymatiques sont dosées.

10 **VALIDATION BIOCHIMIQUE DES RESULTATS IN VITRO**

a) Dosage de l'activité LCAT

- L'activité LCAT est estimée en mesurant la conversion du <sup>14</sup>C-cholestérol libre en <sup>14</sup>C-cholestérol estérifié en utilisant les protéoliposomes en tant que substrat de la manière décrite par Chen et al. (1982). Les protéoliposomes sont préparés à partir de phosphatidyl-choline, du cholestérol, du <sup>14</sup>C-cholestérol et de l'apolipoprotéine AI et mis en incubation avec 20 µl de surnageant de culture de transfection à tester. Les produits (<sup>14</sup>C-cholestérol libre et <sup>14</sup>C-cholestérol estérifié) de la réaction sont séparés, par différence de leur solubilité dans le solvant organique, en chromatographie sur couche mince et détectés par autoradiographie sur Instant Imager (Packard). L'activité LCAT est exprimée en pourcentage du <sup>14</sup>C-cholestérol estérifié par heure et pour 20µl de surnageant testé.

b) Dosage de l'activité CETP

- L'activité CETP est déterminée en mesurant la capacité de cette enzyme à transférer des esters de cholestérol d'une particule lipoprotéique de haute densité (donneur) à une particule lipoprotéique de faible densité (accepteur). Les substrats de cette réaction ont été fournis par un kit Wak-Chemie, Medical GmbH. La fluorescence du linoléate du cholestérol contenu dans la particule donneuse est éteinte à l'état natif de

cette dernière et ce n'est qu'en présence de la CETP active, qui va catalyser le transfert de la molécule fluorescente jusqu'à la particule acceptrice, que l'on peut détecter la fluorescence à 535 nm. L'activité CETP est exprimée en valeur d'intensité de fluorescence émise à 535 nm pour 30µl de surnageant de culture testé et par heure.

#### 5 c) Dosage de l'activité LH

L'activité lipase hépatique est estimée en utilisant un substrat triglycéridique synthétique fourni par un kit Progen Biotechnik GmbH. Ce substrat contient un groupement fluorescent pyrène qui est masqué par le trinitrophénol à l'état natif de la molécule et l'hydrolyse de cette dernière a pour effet l'émission de fluorescence à 400  
10 nm. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à 400 nm après incubation du substrat avec l'échantillon à tester et grâce au plasma standard fourni par le kit on peut estimer la quantité (en pmol/min.) de LH contenu dans 20µl de surnageant.

#### d) Dosage de l'apolipoprotéine AI

15 L'activité Apo AI est estimée en utilisant un anticorps monoclonal anti ApoAI. Pour cela, des plaques Immulon II (Dynatech) sont revêtues avec un anticorps monoclonal anti ApoAI (10mg/ml dans du tampon carbonate pH 9,6), par incubation une nuit à 4°C, puis saturées par 2% BSA en PBS pH 7,4 une heure à 37°C. Les surnageants cellulaires sont ensuite incubés une heure à 37°C, éventuellement après dilution en  
20 PBS 2% BSA. La révélation est ensuite effectuée par incubation une heure à 37°C avec un mélange d'anticorps monoclonaux anti ApoAI marqués à la peroxydase, et dilué au 1/5000. La fixation des anticorps peroxydés est finalement révélée par incubation avec 250µl de TMB (KPL) et lecture des plaques à 630nm.

## 25 TECHNIQUE DE CONSTRUCTION DES PLASMIDES NAVETTES

Les constructions des plasmides bicistroniques sont détaillées dans les figures 3 à 5. Les plasmides bicistroniques obtenus sont, en même temps, les plasmides navettes car ils contiennent les séquences adénovirales pIX-IVa2 nécessaires à la recombinaison avec le génome viral. Cette recombinaison se produit soit par cotransfection avec un  
5 génome clivé venant d'un virus  $\beta$ -galactosidase (vecteur navette classique), soit par double recombinaison dans E-Coli (vecteur navette Coli).

La conformité de séquence de différentes structures plasmidiques est examinée par analyse de leur profil de restriction. Cet examen permet de sélectionner des clones recombinants qui serviront aux clonages ultérieurs ainsi que de valider les résultats  
10 des clonages. Les enzymes de restriction sont choisies de façon à avoir l'information la plus complète possible sur l'intégralité de l'ADNc cloné et le nombre de sites stratégiques pour le clonage. Néanmoins, ce contrôle ne permet pas d'exclure l'existence de certaines mutations telles que mutations ponctuelles de substitution ou de non-sens qui peuvent se produire à tout stade du clonage. De telles mutations ne  
15 peuvent être mises en évidence que par séquençage complet de l'ADNc en question. Le contrôle ultime de la validité des constructions obtenues est fait par des tests biochimiques d'activités enzymatiques de LCAT, de CETP et de LH in vitro, ou la détection de la présence de l'apoA-1.

## 20 EXEMPLE 1 :

### Construction des plasmides navettes LCAT - IRES - CETP

#### 1- Construction du vecteur navette classique pXL 2970

Le vecteur d'expression pXL 2968 RSV LCAT polyA bGH est obtenu par clivage des  
25 plasmides pXL2616, contenant l'ADNc de la LCAT, d'une part et du plasmide pXL LPL, sous contrôle du promoteur de RSV et en amont du signal de polyadénylation du hormone de croissance bovine, d'autre part, par les enzymes de restriction Sal I et ClaI et ligation de fragments résultants par T4 DNA ligase .

Pour se faire:

Les plasmides pXL RSV LPL (2 µg) et pXL 2616 (2 µg) sont chacun digérés par 10 unités (u) de Clal, dans du tampon 4 (20mM Tris acétate, 10mM Mg-acétate, 50mM K-acétate et 1mM DTT) supplémenté avec 100 µg/ml de BSA acétylé, pendant 90' à 37°C. 100mM du NaCl et 10u de Sall sont ajoutés et le mélange réactionnel est remis  
5 en incubation à 37°C pendant encore 90'. Après migration en électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 % des produits des digestions, les bandes de 6,5 et de 1,7 kb correspondant à pXLRSV et à l'ADNc LCAT sont découpées sur gel et extraites par un kit Qiaquick. Les deux bandes sont ligaturées par 400u de T4 DNA ligase après incubation d'une nuit à 14°C.

10 Le plasmide recombinant pXL 2969 IRES-CETP est généré à partir du plasmide bluescript possédant l'ADNc de la CETP modifié à son extrémité 5' par introduction d'un site NcoI par amorce PCR 5' GCCTGATAAC CATGGTGGCT GCCACAG 3' (SEQ ID N°1). Le plasmide ainsi modifié est clivé par NcoI et Sal et cloné en aval de la séquence IRES adénovirale incluse dans le plasmide pSKIRES clivé par les mêmes  
15 enzymes de restriction de la manière suivante:

2,5 µg du plasmide CETP et 2,5 µg du plasmide pSK IRES sont digérés par 10u de NcoI pendant 90' à 37°C dans du tampon 3 (50mM Tris-HCL, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl et 1mM DTT) suivi de la digestion par 10u de Sall pendant 90' à 37°C. Les produits des digestions sont mis en migration électrophorétique et les bandes de  
20 1,5 Kpb (ADNc CETP) et de 3,5 Kpb sont extraites et ligaturées dans les mêmes conditions que décrites dans le paragraphe précédent.

Pour obtenir le plasmide pXL2970, on procède comme suit:

Quatre µg du plasmide pXL 2968 sont linéarisés par 10 u du Sall (tampon 3+BSA, 90' à 37°C). L'ADN est, ensuite, extrait par kit Qiaquick et récupéré dans 50 µl de  
25 l'eau préchauffée à 50°C. Les bouts cohésifs résultants du clivage Sall sont rendus francs par incubation avec 5 u de polymérase Klenow pendant 15' à 25°C, L'ADN est re-extrait au kit Qiaquick et déphosphorylé par 2 u de phosphatase intestinale de veau (CIP) pendant 60' à 37°C. Le plasmide pXL 2969 (4µg) est d'abord digéré par 5U de  
30 Smal (tampon 4, 90' à 25°C) puis par 5U de HincII (tampon 3 +BSA, 100 mM NaCl,

90' à 37°C). Les produits des digestions des 2 plasmides sont soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,7 % et les bandes d'ADN de 8,5 Kpb (pXL 2968) et de 2,2 Kpb (ADNc IRES CETP) sont extraites au kit Qiaquick et ligaturées par 400 u de T4 DNA ligase. (Fig. 3).

5

Les activités LCAT et CETP du plasmide pXL2970 sont dosées sur le surnageant de culture des cellules 293 trois jours après transfection.

L'activité LCAT de ce plasmide correspond à 3,5% d'esters de cholestérol formés par heure et l'activité CETP à 120% (tableau 1 ci-après). Ces valeurs d'activité, montrent que le plasmide pXL2970 synthétise bien de la LCAT et du CETP qui sont catalytiquement actives.

10

## 2) Le plasmide navette-coli LCAT-IRES-CETP

Dans cette technologie, le vecteur navette doit comprendre :

15 -les séquences ITR-répétitions terminales inverses et  $\psi$  séquence d'encapsidation, nécessaires pour la recombinaison homologue dans E. coli, entourant la séquence LCAT-IRES-CETP.

-une origine de répllication col E1 rendant le plasmide non répllicatif dans la souche C2110 E. coli et permettent, ainsi, la clonalité du plasmide recombinant.

20 - un gène suicide saccharose B (létale pour la bactérie en culture sur sucrose) et un gène de résistance à la spectinomycine qui permettront la sélection du clone recombinant.

Pour se faire, le plasmide bicistronique navette pXL2970 RSV LCAT-IRES-CETP est clivé par BstEII et SpeI afin d'y introduire des séquences ITR et  $\psi$  du génome adénoviral et ainsi obtenir un plasmide navette-coli. Les séquences ITR et  $\psi$  sont isolées par digestion du plasmide pXL 2794 par BstEII et XbaI. Le fragment aux bouts francs contenant la cassette spectinomycine-saccharose B, obtenue par digestion du pXL2757 par EcoRV et SmaI a été introduite dans le plasmide navette pXL 2970 + 2794 linéarisé par bFspI (Fig. 4).

30

Expérimentalement on procède selon le protocole suivant:

Trois  $\mu\text{g}$  du plasmide pXL 2970 sont digérés par 20 u de BstEII (tampon 2 : 10mM Tris HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl, 1mM DTT ; 90' à 60°C), puis par 10u de SpeI (90' à 37°C).

Le fragment d'ADN résultant est extrait au kit Qiaquick et déphosphorylé par 2 u de la CIP (60' à 37°C). Le plasmide pXL 2794 est digéré par 20 u de BstEII (tampon 2, 90' à 60°C) suivi de 20 u de XbaI (90' à 37°C). Les bandes de 6,5 Kpb (pXL2970) et de 2,9 Kpb (ITR  $\psi$  et Kan<sup>r</sup> du pXL2794), extraites après migration électrophorétique, sont ligaturés par T4 DNA ligase (40 Ou).

Le plasmide pXL 2970+2794 résultant (1,5  $\mu\text{g}$ ) est clivé par 5 u de FspI (tampon 4, 60' à 37°C), extrait au kit Qiaquick, et ligaturé (T4 DNA ligase, 400 u) avec le fragment d'ADN de 3,8 Kpb extrait du gel contenant la cassette sacB-spect<sup>r</sup> issue de la digestion du plasmide pXL 2757 par 10 u de SmaI (tampon 4, 90' à 25°C) suivi de 10 u de EcoRV (90' à 37°C).

Le plasmide navette pXL2974 LCAT-IRES-CETP subit une première sélection sur milieu spectinomycine et milieu spectinomycine+saccharose. Les résultats des digestions NcoI (6,2+3+2,2+2), NotI (13,5 Kpb) et EcoRV (1+3+9,5 Kpb) sont en conformité avec la carte de restriction dudit plasmide.

L'activité LCAT du plasmide pXL2974 correspond à 2% d'esters de cholestérol formés par heure et celle de la CETP à 114% (tableau 1). On retrouve les activités LCAT et CETP au niveau du plasmide navette-coli LCAT-IRES-CETP.

	ACTIVITE LCAT	ACTIVITE CETP
Plasmide navette LCAT-IRES-CETP	3,5 +/- 0,2%	120 +/-2%
Plasmide navette-coli LCAT-IRES-CETP	2 +/- 0,2%	114 +/-2%

Tableau 1

**EXEMPLE 2:****Construction du plasmide navette RSV LCAT-IRES-LH**

L'ADNc de la LH est cloné derrière l'IRES dans le vecteur bluescript et le fragment  
 5 IRES-LH ensuite inclus d'une façon analogue au vecteur LCAT-IRES-CETP selon le  
 protocole suivant:

Le plasmide pXL 2971 (4 µg) est digéré, afin d'éliminer un site NcoI, par 40 U.I. de  
 BglII (tampon 3, 90' à 37°C) et puis par 40u de Sall pendant 90' à 37°C. Le fragment  
 d'ADN de 2,5 Kpb (de masse approximative de 0,5 µg) issu de ces digestions est  
 10 soumis, après migration et extraction sur gel, à une digestion ménagée par NcoI (0,1-1  
 u NcoI/µg d'ADN) dans du tampon 4 pendant 60' à 37°C. Les produits de digestion  
 sont analysés par migration sur gel d'agarose à 0,7 % et la bande de 1,5 Kpb  
 contenant le ADNc LH ABC, obtenue avec 0,5 u de NcoI, est ligaturé (T4 DNA  
 ligase, 400 u) avec le fragment pSK IRES (1,3 µg) résultant des digestions NcoI et  
 15 Sall (1u de chaque enzyme, tampon 3, 37°C).

Le vecteur final est présenté en figure 5. Le plasmide bicistronique navette LCAT-  
 IRES-LH correspondant porte le nom de pXL2984.

	ACTIVITE LCAT	ACTIVITE LH
Plasmide navette LCAT-IRES-LH	1,2 +/- 0,2%	46 +/-2%

20

Tableau 2

**EXEMPLE 3****Construction du plasmide navette ApoAI-IRES-LCAT**

25

Le principe général de cette construction est identique aux précédents. La LCAT est  
 mutée par PCR en incluant un site supplémentaire NcoI permettant sa ligation en

bonne place derrière l'IRES. Sa séquence a été entièrement vérifiée. Le fragment IRES-LCAT est ensuite ligué derrière l'apoA-1. Le vecteur résultant est issu directement de la technologie Coli et porte le nom de pXL 3058 (figure 6). Après les double recombinaisons habituelles le vecteur viral résultant a été vérifié en activité.

- 5 L'apoA-I a été détectée en western blot et l'activité LCAT évaluée à 1.3% (bruit de fond à 0.2%).

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

5

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron

(C) VILLE: ANTONY

10

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

(G) TELEPHONE: 01.55.71.69.22

(H) TELECOPIE: 01.55.71.72.96

15

(ii) TITRE DE L' INVENTION: VIRUS RECOMBINANTS BICISTRONIQUES  
UTILES POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES AUX  
DYSLIPOPROTEINEMIES

20

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

25

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 27 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

35

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADnc

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCCTGATAAC CATGGTGGCT GCCACAG

45

**REVENDICATIONS**

1. Virus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et  
5 impliqués dans le transport inverse du cholestérol, lesdits acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.
2. Virus recombinant défectif selon la revendication 1 caractérisé en ce que les acides nucléiques insérés sont choisis parmi les gènes codant pour tout ou partie de  
10 la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), la protéine de transfert des esters du cholestérol (CETP), la lipase hépatique (LH), les apolipoprotéines AI ou AIV, ou un variant de celles-ci.
3. Virus recombinant défectif selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que les acides nucléiques sont préférentiellement les gènes codant pour tout ou partie  
15 des enzymes, protéines et/ou co-facteurs correspondants humains.
4. Virus recombinant défectif selon les revendications précédentes caractérisé en ce que les acides nucléiques sont plus préférentiellement des ADNc ou ADNg.
5. Virus recombinant défectif selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'un des acides nucléiques code pour la LCAT.
- 20 6. Virus recombinant défectif selon la revendication 5 caractérisé en ce que le second acide nucléique code pour la CETP, la LH ou l'ApoAI..
7. Virus recombinant défectif selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le promoteur transcriptionnel est de préférence choisi parmi les promoteurs des séquences d'acides nucléiques E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur  
25 CMV, LTR-RSV, MT-1, SV40.

8. Virus recombinant défectif selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence IRES dérive d'un picornavirus.

9. Virus recombinant défectif selon la revendication 8 caractérisé en ce que la séquence IRES de picornavirus est issue soit du virus encéphalomyocarditis ou du poliovirus.

10. Virus recombinant défectif selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est dépourvu au moins des régions de son génome qui sont nécessaires à sa répllication dans la cellule infectée.

11. Virus recombinant défectif selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence d'un adénovirus, de préférence de type Ad 5 ou Ad 2 humain ou d'origine animale.

12. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, lesdits acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

13. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène codant pour la LCAT et un gène codant pour la LH, lesdits gènes étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

14. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène codant pour la LCAT et un gène codant pour l'apoA-I, lesdits gènes étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

15. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène codant pour la LCAT et un gène codant pour la CETP, lesdits gènes étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome IRES.

16. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il dérive de la recombinaison homologue entre le pXL2974 et le pXL2822.

17. Adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 12 à 16 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E3.

18. Plasmide procaryote comprenant un génome d'adénovirus et au moins deux acides nucléiques codant pour des protéines, enzymes et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, les deux acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome, IRES.

19. Plasmide procaryote comprenant une première région permettant la réplication dans les cellules procaryotes et une deuxième région comportant le génome adénoviral bordé d'un ou plusieurs sites de restriction non présent(s) dans ledit génome et dans laquelle sont présents au moins deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, ces deux acides nucléiques étant liés opérationnellement à un promoteur transcriptionnel et séparés l'un de l'autre par une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome, IRES.

20. Plasmide procaryote selon la revendication 18 ou 19 caractérisé en ce que le génome adénoviral est délété de ses régions E1 et E3.

21. Plasmide procaryote selon l'une des revendications 18 à 20 caractérisé en ce qu'il comprend les séquences virales ITR et  $\psi$ .

22. Plasmide procaryote selon l'une des revendications 18 à 21 caractérisé en ce que l'origine de réplication est issue d'un plasmide bactérien choisi parmi RK2, pBR322 et pUC.

23. Plasmide procaryote comprenant en orientation 5'-3' au moins une origine  
5 de réplication fonctionnelle dans les cellules procaryotes, une première partie d'un  
génome adénoviral comprenant les séquences virales ITR et  $\psi$ , un promoteur  
transcriptionnel, un premier acide nucléique codant pour une enzyme, protéine et/ou  
co-facteur impliqué dans le transport inverse du cholestérol, une séquence IRES, un  
10 second acide nucléique codant pour une enzyme, protéine et/ou co-facteur impliqué  
dans le transport inverse du cholestérol, un site e polyadénylation et une second  
partie d'un génome adénoviral constituée par la région pIX-IVa2.

24. Plasmide procaryote selon l'une des revendications 18 à 23 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une région permettant la sélection des cellules procaryotes contenant ledit plasmide.

15 25. Plasmide procaryote selon l'une des revendications 18 à 24 caractérisé en ce qu' au moins l'un des acides nucléiques code pour la LCAT et le second acide nucléique est choisi parmi ceux codant pour la LH, l'ApoAI ou la CETP.

20 26. Plasmide procaryote selon la revendication 25 caractérisé en ce qu'il s'agit du pXL 2974 contenant les acides nucléiques codant respectivement pour la LCAT et la CETP.

25 27. Plasmide procaryote selon la revendication 25 caractérisé en ce qu'il s'agit du pXL 3058 contenant les acides nucléiques codant respectivement pour la LCAT et l'ApoAI.

28. Plasmide navette caractérisé en ce qu'il comprend deux acides nucléiques codant pour des enzymes, protéines et/ou co-facteurs distincts et impliqués dans le transport inverse du cholestérol, les deux acides nucléiques étant liés

opérationnellement à un promoteur transcriptionnel, un site de polyadénylation et une séquence codant pour un site d'entrée interne du ribosome, IRES située entre les deux acides nucléiques.

5           29. Plasmide navette selon la revendication 28 caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pXL2984 comprenant deux acides nucléiques codant respectivement pour la LH et la LCAT.

10           30. Plasmide navette selon la revendication 28 caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pXL2970 comprenant deux acides nucléiques codant respectivement pour la LCAT et la CETP.

31. Cellule procaryote transformée avec un plasmide procaryote selon l'une des revendications 18 à 27.

15           32. Utilisation d'un virus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 11, d'un adénovirus recombinant selon l'une des revendications 12 à 17 ou d'un plasmide selon l'une des revendications 28 à 30 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des pathologies liées à l'hypoalphalipoprotéïnémie.

20           33. Utilisation selon la revendication 32 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de l'athérosclérose et/ou de la resténose.

34. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs virus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 11, un adénovirus selon l'une des revendications 12 à 17 ou un plasmide selon l'une des revendications 28 à 30.

25           35. Composition pharmaceutique selon la revendication 34 caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme injectable et en ce qu'elle comprend de  $10^4$  à  $10^{14}$  pfu/ml d'adénovirus.

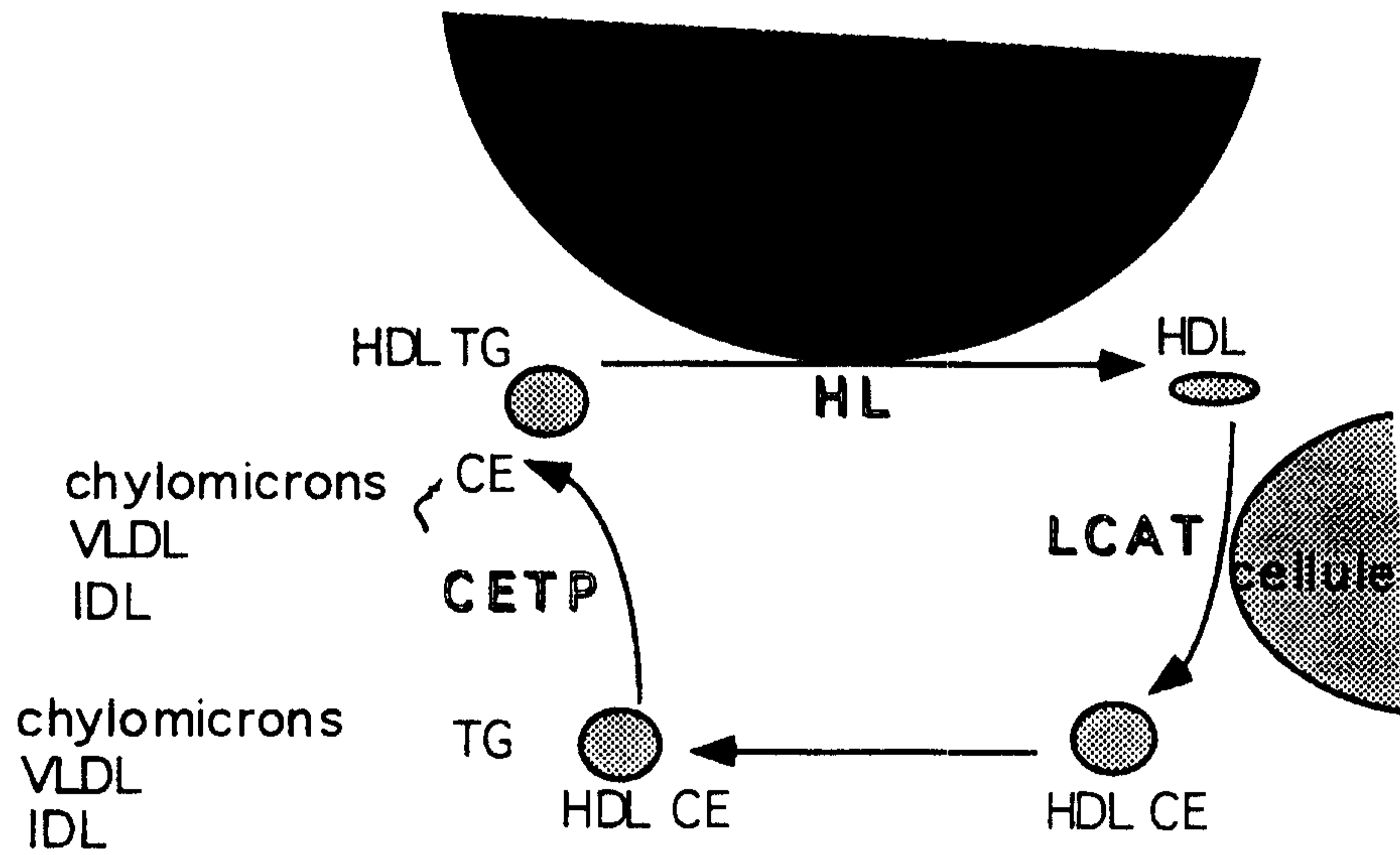


Figure 1

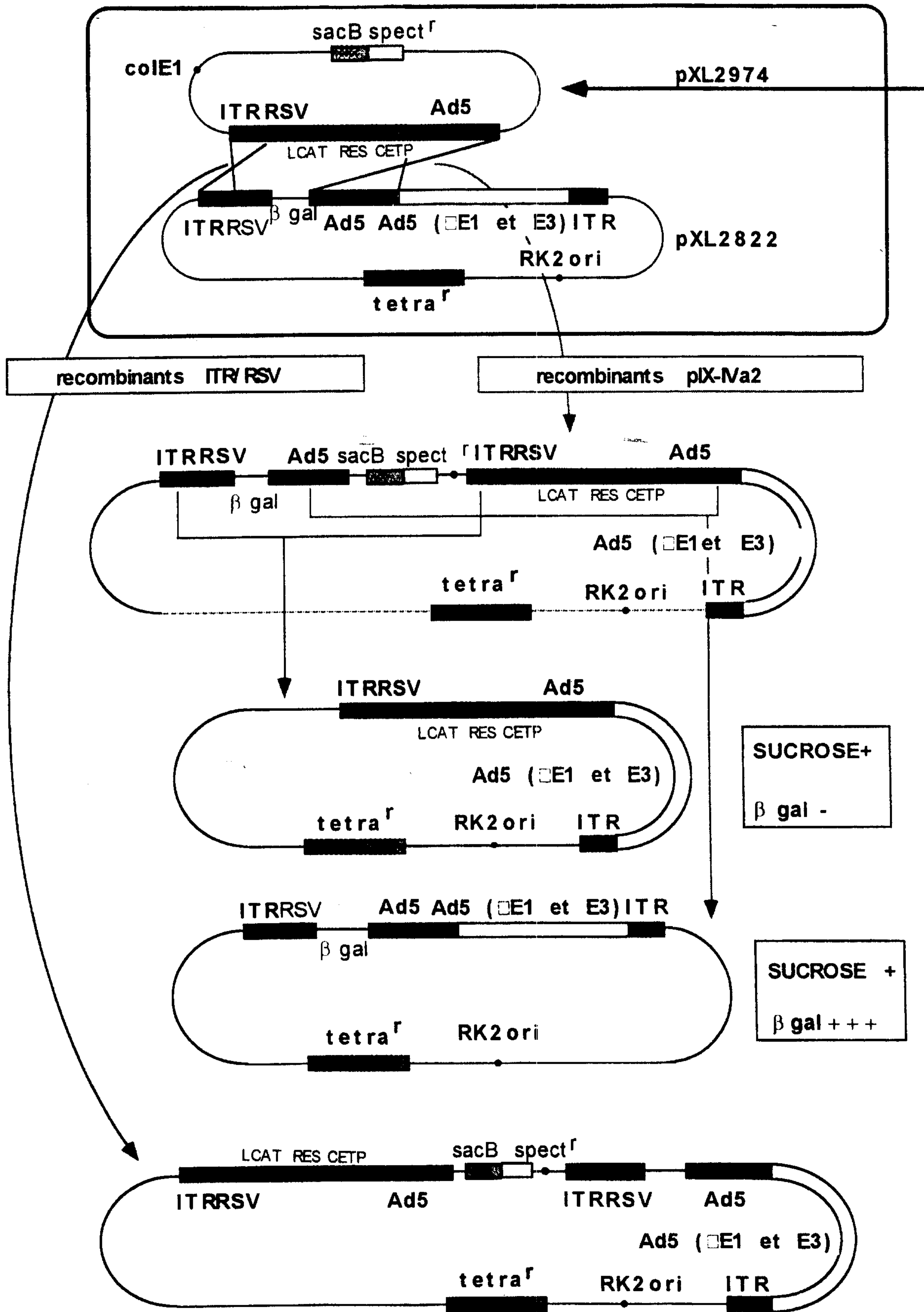


Figure 2

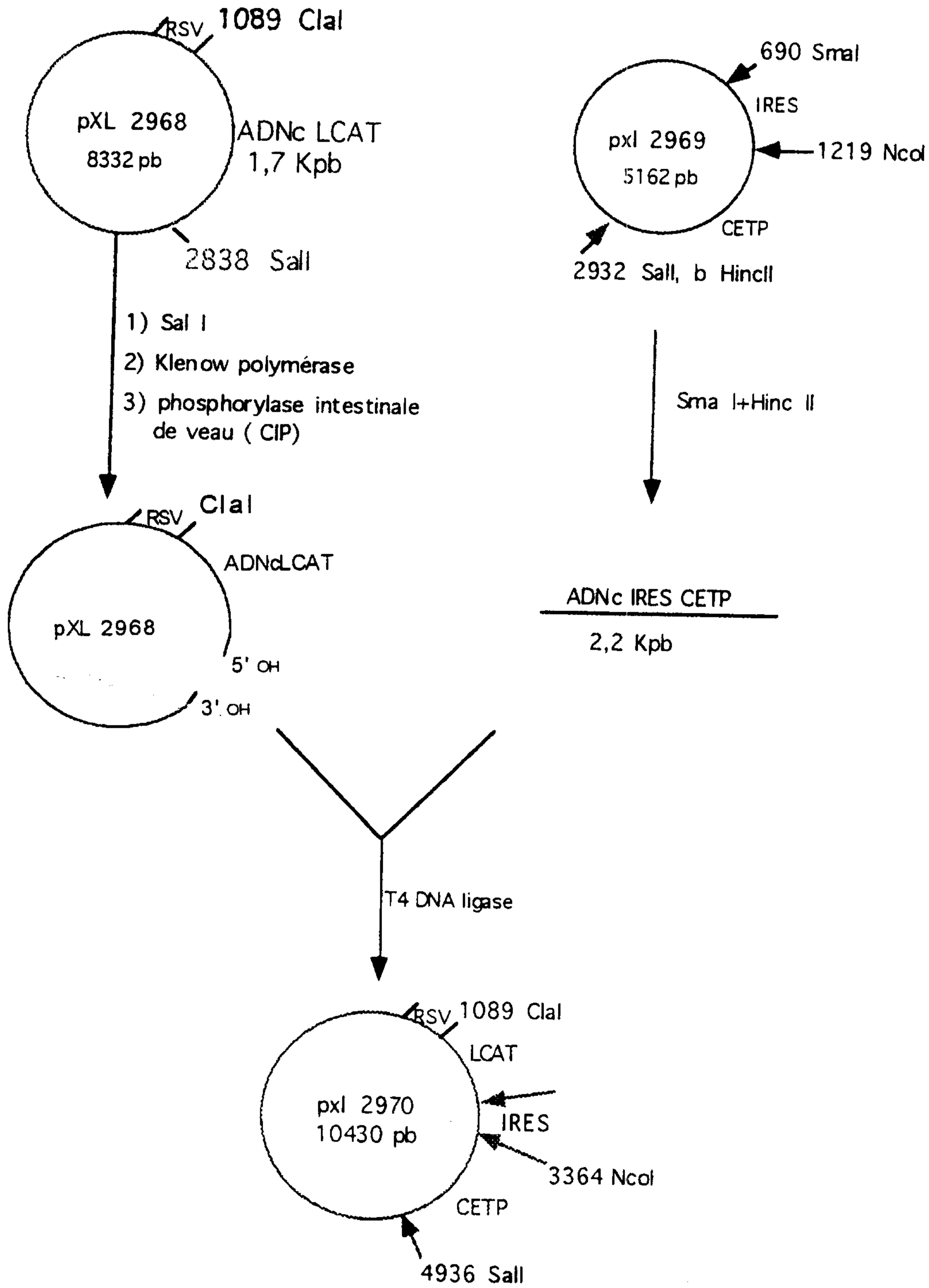


Figure 3.

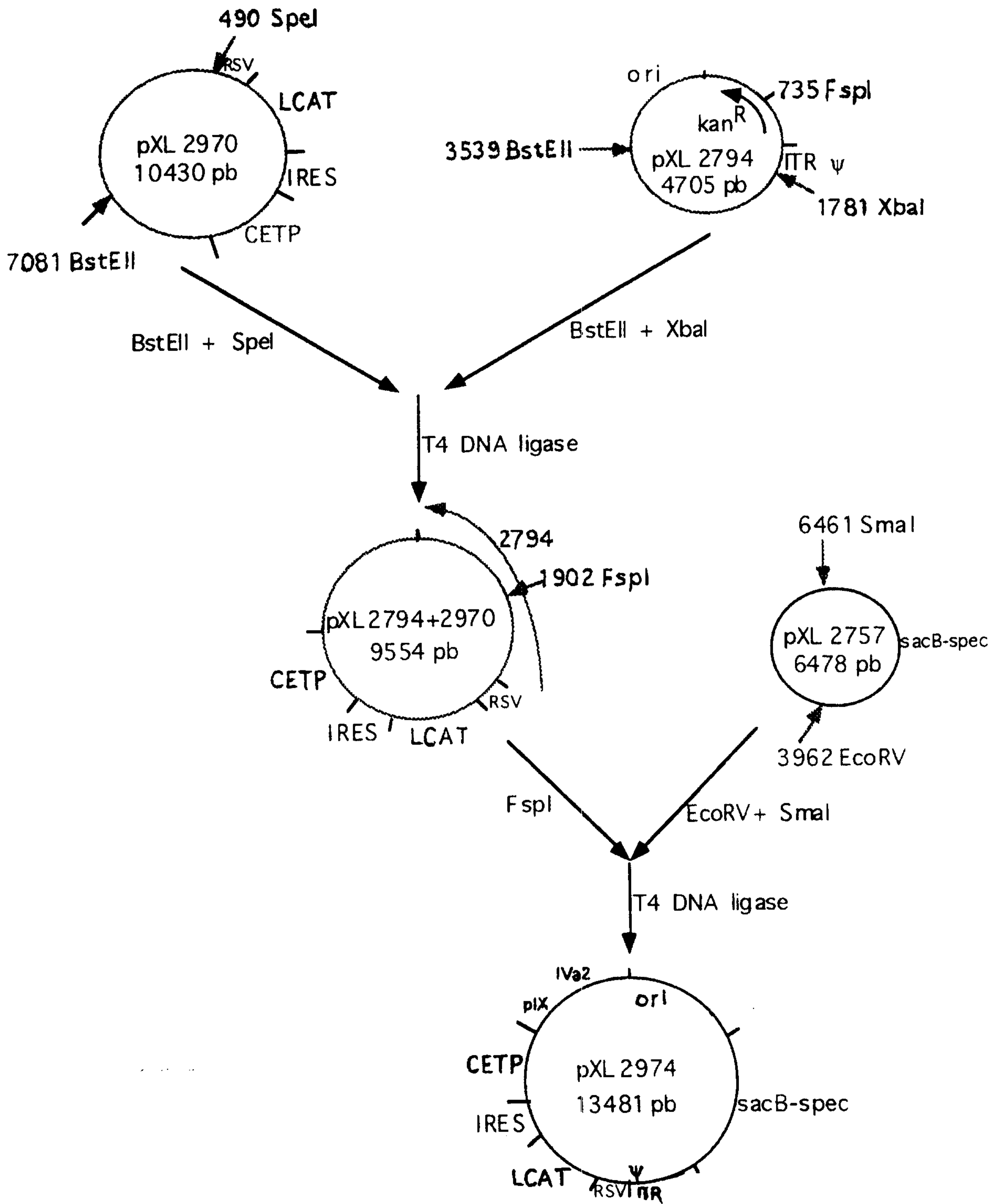


Figure 4

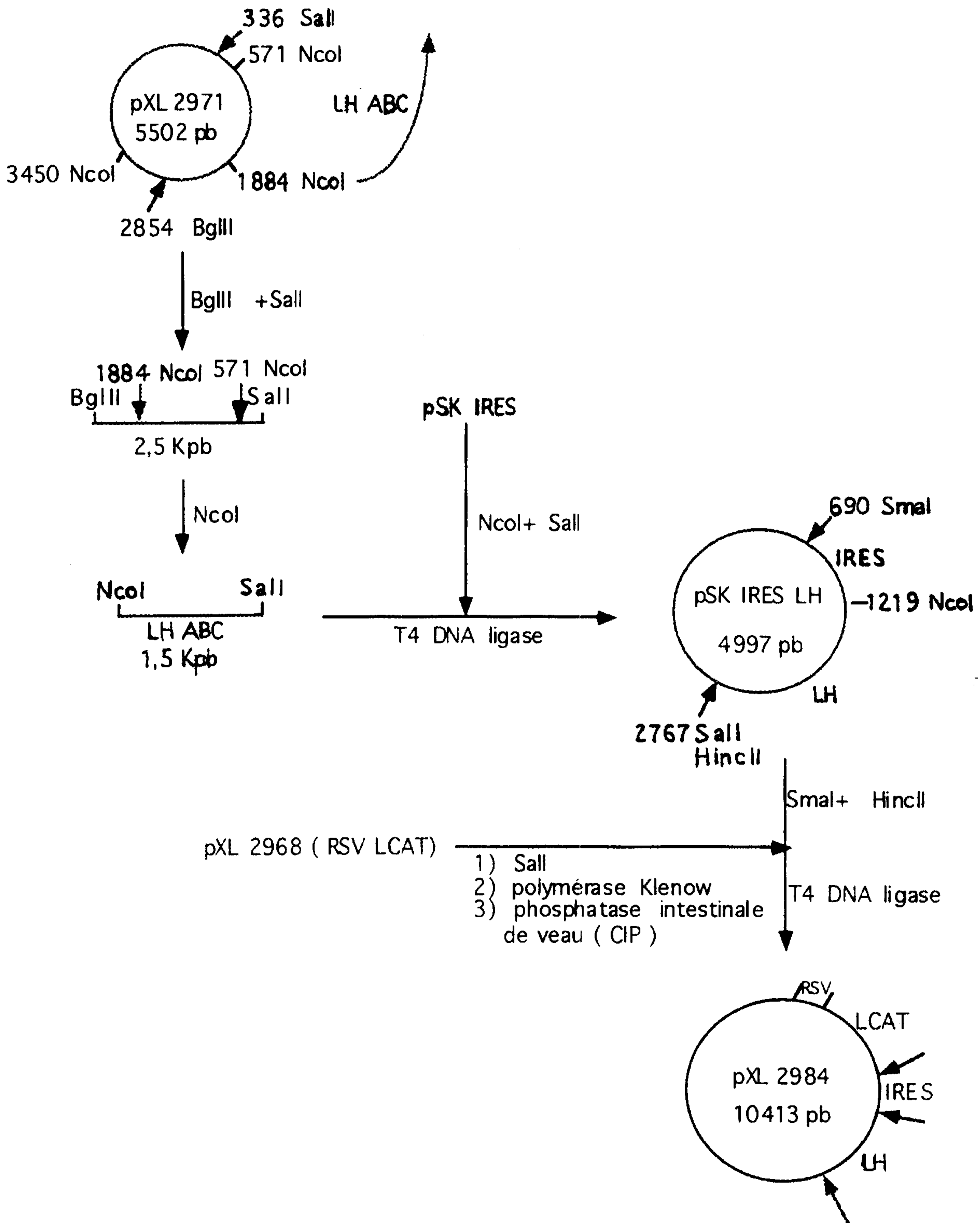


Figure 5

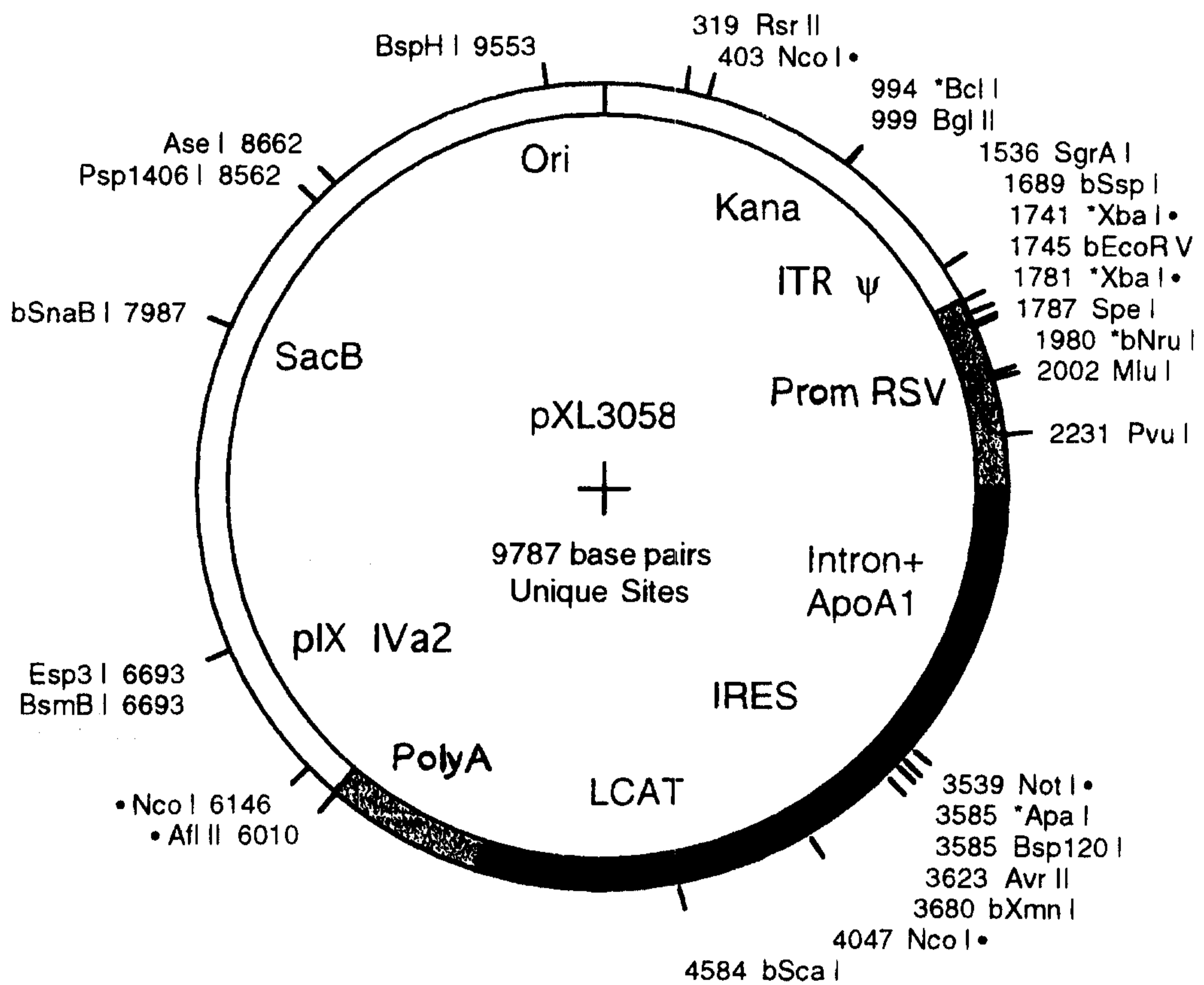


Figure 6