

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 juillet 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/052004 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N 15/12, C07H 14/47, C12N 15/63, 5/10, A01K
67/027, C12Q 1/68, C12P 21/00, C07K 16/18, G01N
33/53, 33/68, A61K 38/17, 39/395, 48/00

F-75007 Paris (FR). **PASSER, Brent** [US/FR]; 40 Boulevard Saint-Marcel, F-75005 Paris (FR). **ROPERCH, Jean-Pierre** [FR/FR]; 7, rue Pasteur, F-78270 Lommoye (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/04199

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Régimbeau, 20, rue des Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(22) Date de dépôt international :

26 décembre 2001 (26.12.2001)

(81) États désignés (*national*) : CA, JP, US.

(25) Langue de dépôt :

français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/17028 26 décembre 2000 (26.12.2000) FR

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :

MOLECULAR ENGINES LABORATORIES [FR/FR];
20, rue Bouvier, F-75011 Paris (FR).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*
— *avec revendications modifiées*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **AMSON, Robert** [LU/FR]; 10, rue Gay Lussac, F-75005 Paris (FR).
TELERMAN, Adam [BE/FR]; 6, rue du Pré-aux-Clercs,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: GENE INVOLVED IN APOPTOSIS REGULATION

(54) Titre : GENE IMPLIQUE DANS LA REGULATION DE L'APOPTOSE

(57) Abstract: The invention concerns a nucleic acid sequence involved in apoptosis regulation and tumoral reversion of the p53 path, and the protein encoded by said nucleic acid sequence, as well as methods for detecting, identifying and/or screening compounds for use in treating cancers and certain neurodegenerative diseases, related to dysfunction in tumour suppression regulation and/or apoptosis in the biological chain of p53, said methods being based on interaction between TSIP4 and TSIP2.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une séquence d'acide nucléique dans la régulation de l'apoptose et de la réversion tumorale de la voie de p53, ainsi que la protéine codée par cette séquence d'acide nucléique, ainsi que des méthodes de détection, identification et/ou criblage de composés pouvant notamment être utilisés pour le traitement des cancers ou de certaines maladies neuro-dégénératives, liés à des dérèglements dans la régulation de la suppression tumorale et/ou de l'apoptose, dans la chaîne biologique de p53, lesdits procédés étant basés sur l'interaction entre TSIP4 et TSIP2.



WO 02/052004 A1

GENE IMPLIQUE DANS LA REGULATION DE L'APOPTOSE

La présente invention concerne une séquence d'acide nucléique
5 impliquée dans la régulation de l'apoptose et de la réversion tumorale de la voie de p53, ainsi que la protéine codée par cette séquence d'acide nucléique.

L'apoptose, ou mort cellulaire, est un phénomène complexe qui est régulé par de nombreuses protéines, dont la protéine p53. cette protéine interagit avec de nombreuses autres protéines, et son expression, qui induit les phénomènes de mort
10 cellulaire et de réversion tumorale, peut être corrélée avec l'induction ou la répression de l'expression d'autres gènes cellulaires.

Les inventeurs de la présente invention ont ainsi mis en évidence des gènes induits et activés lors de la cascade menant à la répression tumorale et/ou l'apoptose (TSAP pour « Tumor Suppressor Activated Pathway »), ou des gènes réprimés
15 (TSIP pour « Tumor Suppressor Inhibited Pathway »). Ces gènes ont fait notamment l'objet des demandes de brevets WO 97/22695 ou WO 00/08147.

Il est important de pouvoir comprendre précisément les mécanismes de la cascade de p53, afin de pouvoir générer de nouveaux composés ayant une activité antitumorale (pouvant notamment induire l'apoptose ou la suppression tumorale),
20 ou pouvant être utilisés pour le traitement de maladies neuro-dégénératives. En effet, les inventeurs de la présente demande ont démontré que la préséniline 1 (PS1), dont la rôle avait été suggéré dans la maladie d'Alzheimer, était identique à la protéine TSIP 2 décrite dans la demande WO 97/22695. Ainsi, il est légitime de rechercher des médicaments pouvant interférer dans l'apoptose, afin de réduire ce
25 phénomène, et qui pourraient être utilisés dans les maladies neuro-dégénératives.

Les inventeurs de la présente demande ont mis en évidence l'interaction de la protéine TSIP 2 (préséniline 1, PS1) avec une protéine, dont il a été montré qu'elle est elle-même réprimée dans un modèle de mort cellulaire. Cette protéine (SEQ ID N° 2) a ainsi été appelée TSIP4, et c'est un objet de la présente invention,
30 ainsi que les séquences nucléiques qui codent pour ladite protéine. On préférera notamment le gène TSIP4, étant entendu que par gène, on pourra entendre soit la séquence d'ADNc, soit la séquence d'ADN génomique, avec ou sans les éléments régulateurs.

Ainsi, la présente invention a pour objet un acide nucléique purifié ou isolé,
5 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :

- a) SEQ ID N° 1 ;
- b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 ;
- 10 c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
- d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) ;
- 15 e) la séquence complémentaire ou la séquence de l'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).

La séquence d'acides nucléiques selon l'invention définie en c) présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence telle que définie en a) ou b) ci-dessus, de préférence 90 %, de façon plus
20 préférée 95 %, de façon la plus préférée 98 %, ou 99 %.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou
25 non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADNs. Ainsi, les séquences nucléiques selon l'invention englobent également les PNA (Peptid Nucleic Acid), ou analogues.

30 Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur

environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences SEQ ID N° 1 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 % d'identité après alignement optimal entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre d'illustration, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour

des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N° 1, ou de ses fragments, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles de la séquence SEQ ID N° 1. Ces séquences mutées naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment, à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie, comme par exemple une dégénérescence cellulaire. De préférence, la présente invention concerne les séquences nucléiques variantes dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence d'acides aminés du polypeptide, ou de ses fragments, codés par la séquence normale de SEQ ID N° 1.

On entend également désigner par séquence nucléique variante tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou variation d'un site d'épissage de la séquence nucléique génomique dont l'ADNc a pour séquence SEQ ID N° 1.

L'invention concerne de préférence un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de la séquence SEQ ID N° 1, de sa séquence complémentaire ou de la séquence de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1.

L'invention concerne également un acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 100, de façon plus préférée 150, de façon la plus préférée 200 acides aminés de la protéine SEQ ID N° 2.

Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de l'invention.

Ainsi, la présente invention concerne également les amorces ou les sondes selon l'invention qui peuvent permettre en particulier de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique des gènes dont l'ADNc est représenté par SEQ ID N° 1, en utilisant

notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection,
5 l'identification, le dosage ou l'amplification de séquence d'acide nucléique.

Selon l'invention, les polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 15 bases, de préférence de 20 bases, ou mieux de 25 à 30 bases.

10 Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent
15 être utilisées directement comme sonde ou amorce.

Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives.

20 Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou le ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

25 Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le
30 brevet américain U.S. N° 4,683,202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de

l'amplification peut être contrôlée en utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des
5 réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés.

L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

10 D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en œuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes
15 de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement
20 Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwok et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli et al. (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription
25 Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al. (1990), la technique d'amplification à la Q-béta-réplique décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

30 Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantageusement, préalablement à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en œuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase

inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses
5 (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) et à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont
10 détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à
15 capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut ainsi citer en
20 particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

25 De tels oligonucléotides peuvent être utilisés en tant que produits thérapeutiques et médicaments pour réguler les phénomènes d'apoptose et de répression tumorale. L'utilisation de ses séquences sens ou antisens peut également être mise en oeuvre *in vitro*, pour définir de nouveaux moyens de modèle et d'étude de l'apoptose.

30 La présente invention concerne également un polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

a) un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ;

- b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;
- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a) , b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

10 Par « polypeptide », on entend, au sens de la présente invention, désigner des protéines ou des peptides.

Par « fragment biologiquement actif », on entend un fragment possédant la même activité biologique que le fragment peptidique dont il est déduit, de préférence dans le même ordre de grandeur (à un facteur 10 près). Ainsi, les
15 exemples montrent que la protéine TSIP4 (SEQ ID N° 2) a un rôle potentiel dans les phénomènes d'apoptose. Un fragment biologiquement actif de la protéine TSIP4 consiste donc en un polypeptide issu de SEQ ID N° 2 possédant également un rôle dans l'apoptose.

De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué
20 de la séquence SEQ ID N° 2 (correspondant à la protéine codée par le gène TSIP4) ou d'une séquence possédant au moins 80 % d'identité avec SEQ ID N° 2 après alignement optimal.

La séquence du polypeptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2, de préférence 90
25 ou 95 %, de façon plus préférée 98 %, ou 99 %.

Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de
30 référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée

98 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ou avec l'un de ses fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences nucléiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation
5 correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport à la séquence SEQ ID N° 2 ou avec l'un de ses fragments, de manière plus préférée les polypeptides variants présentant une mutation liée à une pathologie, comme un cancer ou une maladie neuro-dégénérative.

10 La présente invention concerne également les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou codant pour un polypeptide selon l'invention. Un tel vecteur peut également contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion du polypeptide dans une cellule hôte. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

15 Les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence de promoteur et/ou de régulateur selon l'invention, font également partie de l'invention.

Lesdits vecteurs comportent de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de
20 régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention
25 peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des
30 rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

- 5 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse
10 artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

- De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte
15 approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

- L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention ainsi que
20 les animaux transgéniques, de préférence les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. Ces animaux peuvent être utilisés en temps que modèles, pour l'étude de l'étiologie de maladies inflammatoires et/ou immunes, et en particulier des maladies inflammatoires du tube digestif, ou pour l'étude de cancers.

- 25 Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais aussi les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). On peut citer également les cellules d'insectes
30 dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en œuvre des baculovirus (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué par les cellules COS.

Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère des animaux tels que les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, exprimant un polypeptide selon l'invention.

5 Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère également des animaux tels que les souris, les rats ou les lapins, caractérisés en ce que le gène codant pour la protéine de séquence SEQ ID N° 2, ou dont la séquence est codée par le gène homologue chez ces animaux, n'est pas fonctionnel, est invalidé ou présente au moins une mutation.

10 Ces animaux transgéniques sont obtenus par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

15 Les animaux transgéniques selon l'invention peuvent ainsi surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'invention, ou leur gène homologue, ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation. Ces animaux transgéniques, en particulier des souris, sont obtenus par exemple par transfection de copie de ce gène sous contrôle d'un promoteur fort de nature ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu, ou après transcription virale.

20 Alternativement, les animaux transgéniques selon l'invention peuvent être rendus déficients pour le gène codant pour le polypeptide de la séquence SEQ ID N° 2, ou son gène homologue, par inactivation à l'aide du système LOXP/CRE recombinase (Rohlmann et al., 1996) ou de tout autre système d'inactivation de l'expression de ce gène.

25 Les cellules et mammifères selon l'invention sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide selon l'invention, comme décrit ci-dessous, et peuvent également servir à titre de modèle d'analyse.

30 Les cellules ou mammifères transformés tels que décrits précédemment peuvent aussi être utilisés à titre de modèles afin d'étudier les interactions entre les polypeptides selon l'invention, et les composés chimiques ou protéiques, impliqués directement ou indirectement dans les activités des polypeptides selon l'invention, ceci afin d'étudier les différents mécanismes et interactions mis en jeu.

Ils peuvent en particulier être utilisés pour la sélection de produits interagissant avec les polypeptides selon l'invention, notamment la protéine de

séquence SEQ ID N° 2 ou ses variants selon l'invention, à titre de cofacteur, ou d'inhibiteur, notamment compétitif, ou encore ayant une activité agoniste ou antagoniste de l'activité des polypeptides selon l'invention. De préférence, on utilise lesdites cellules transformées ou animaux transgéniques à titre de modèle
5 notamment pour la sélection de produits permettant de lutter contre les pathologies liées à une expression anormale de ce gène.

L'invention concerne également l'utilisation d'une cellule, d'un mammifère ou d'un polypeptide selon l'invention pour le criblage de composés chimiques ou biochimiques pouvant interagir directement ou indirectement avec les polypeptides
10 selon l'invention, et/ou capable de moduler l'expression ou l'activité de ces polypeptides.

De la même façon, l'invention concerne aussi un procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo* avec un acide nucléique selon l'invention, en utilisant un acide nucléique, une cellule ou un mammifère selon
15 l'invention, et en détectant la formation d'un complexe entre les composés candidats et l'acide nucléique selon l'invention.

Les composés ainsi sélectionnés sont également objets de l'invention.

Un tel composé selon l'invention peut être un composé ayant une structure chimique, un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride
20 protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide, ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques.

Parmi les composés chimiques envisagés, ils peuvent contenir un ou plusieurs cycles, aromatique(s) ou non, ainsi que plusieurs résidus de toute sorte (notamment alkyle inférieur, c'est-à-dire présentant entre 1 à 6 atomes de carbones).

25 L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention pour la synthèse de polypeptides recombinants.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules ou mammifères de
30 la présente invention, dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les polypeptides recombinants, caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par ladite méthode de production, font également partie de l'invention.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent
5 aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en particulier dans les solvants aqueux.

De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par
10 exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide
15 nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes
20 d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir
25 de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par
30 synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Stewart et al., 1984) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de
5 reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention, font partie de l'invention.

Des anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus à partir d'un sérum d'un animal immunisé contre les polypeptides selon l'invention, notamment produit par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique, selon les modes
10 opératoires usuels.

On note notamment l'intérêt d'anticorps reconnaissant de façon spécifique certains polypeptides, variants, ou leurs fragments immunogènes, selon l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de
15 reconnaître spécifiquement le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 sont particulièrement préférés.

Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (1975).

Les anticorps selon l'invention sont, par exemple, des anticorps
20 chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent
25 en œuvre un anticorps selon l'invention.

L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent
30 également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des polypeptides selon l'invention, notamment le

polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou l'un de ses variants, sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immuno-conjugués enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée.

Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention, ainsi qu'une trousse permettant de mettre en œuvre un tel procédé. Une telle trousse contient en particulier :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'invention ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés dans le traitement d'une maladie neuro-dégénérative, ou d'un cancer, chez l'homme, lorsque l'on observe une expression anormale du gène TSIP4, PS1, p53, ou un gène décrit par les inventeurs de la présente demande, dans la demande WO 97/22695 ou WO 00/08147. Une expression anormale signifie une surexpression, une sous-expression ou l'expression d'une protéine mutée.

Ces anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain, ou à partir d'animaux immunisés avec des polypeptides selon l'invention, puis « humanisés », et peuvent être utilisés tels quels ou dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies précitées.

Font également partie de l'invention, les méthodes de détermination d'une variabilité allélique, d'une mutation, d'une délétion, d'une perte d'hétérozygotie ou de toute anomalie génétique du gène selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles

mettent en œuvre une séquence d'acide nucléique, un polypeptide ou un anticorps selon l'invention.

On peut détecter les mutations dans la séquence du gène TSIP4 réprimé lors de l'apoptose induite par p53, directement par analyse de l'acide nucléique et des séquences selon l'invention (ADN génomique, ARN, ou ADNc), mais également
5 par l'intermédiaire des polypeptides selon l'invention. En particulier, l'utilisation d'un anticorps selon l'invention qui reconnaît un épitope portant une mutation permet de discriminer entre une protéine « saine » et une protéine « associée à une pathologie ».

10 La description précise des mutations observables dans le gène TSIP4 peut permettre ainsi de poser les bases d'un diagnostic moléculaire des maladies neuro-dégénératives et les cancers, ou toute maladie impliquant l'apoptose. Une telle démarche, basée sur la recherche de mutations dans le gène, permettra de contribuer au diagnostic de ces maladies et éventuellement de réduire l'importance de certains
15 examens complémentaires invasifs ou coûteux. L'invention pose les bases d'un tel diagnostic moléculaire basé sur la recherche de mutations dans TSIP4.

En particulier, on préfère une méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au
20 moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène.

Cette méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique peut être utilisée de façon préventive (étude d'une prédisposition à une maladie neuro-dégénérative
25 ou au cancer), ou afin de servir à l'établissement et/ou la confirmation d'un état clinique chez un patient.

De préférence, la maladie neuro-dégénérative est la maladie d'Alzheimer.

L'analyse peut être effectuée par séquence de tout ou partie du gène, ou par d'autres méthodes connues de l'homme du métier. On peut en particulier utiliser
30 des méthodes basées sur la PCR, par exemple la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

On peut également effectuer l'analyse par fixation d'une sonde selon l'invention correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 sur une puce à ADN

et l'hybridation sur ces microplaques. Une puce à ADN contenant une séquence selon l'invention est également un des objets de l'invention.

De même, une puce à protéines contenant une séquence d'acides aminés selon l'invention est aussi un objet de l'invention. Une telle puce à protéines permet
5 l'étude des interactions entre les polypeptides selon l'invention et d'autres protéines ou des composés chimiques, et peut ainsi être utile pour le criblage de composés interagissant avec les polypeptides selon l'invention. On peut également utiliser les puces à protéines selon l'invention pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre les polypeptides selon l'invention dans le sérum de patients. On peut aussi
10 mettre en œuvre une puce à protéines contenant un anticorps selon l'invention.

L'homme du métier sait également mettre en œuvre des techniques permettant l'étude de l'altération de l'expression d'un gène, par exemple par l'étude de l'ARNm (en particulier par Northern Blot ou par des expériences de RT-PCR, avec des sondes ou des amorces selon l'invention), ou de la protéine exprimée, en
15 particulier par Western Blot, en utilisant des anticorps selon l'invention.

L'invention se rapporte également à des procédés d'obtention d'un allèle du gène TSIP4, associé à un phénotype détectable, comprenant les étapes suivantes :

- a) obtenir un échantillon d'acide nucléique d'un individu exprimant ledit phénotype détectable ;
- 20 b) mettre en contact ledit échantillon d'acide nucléique avec un agent capable de détecter spécifiquement un acide nucléique codant pour la protéine TSIP4 ;
- c) isoler ledit acide nucléique codant pour la protéine TSIP4.

Un tel procédé peut être suivi d'une étape de séquence de tout ou partie de
25 l'acide nucléique codant pour la protéine TSIP4, ce qui permet de prédire la susceptibilité à une maladie neuro-dégénérative ou à un cancer.

L'agent capable de détecter spécifiquement un acide nucléique codant pour la protéine TSIP4 est avantageusement une sonde d'oligonucléotides selon l'invention, qui peut être formée d'ADN, d'ARN, de PNA, modifiés ou non. Les
30 modifications peuvent inclure un marquage radioactif ou fluorescent, ou être dues à des modifications dans les liaisons entre les bases (phosphorothioates, ou méthylphosphonates par exemple). L'homme du métier connaît les protocoles permettant d'isoler une séquence spécifique d'ADN. L'étape b) du procédé ci-

dessus décrit peut également être une étape d'amplification telle que décrite précédemment.

L'invention se rapporte également à un procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant
5 les étapes suivantes de mise en contact d'une sonde selon l'invention avec un échantillon biologique et de détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

L'homme du métier sait mettre en œuvre un tel procédé, et peut en particulier utiliser une trousse de réactifs comprenant :

- 10 a) un polynucléotide selon l'invention, utilisé en tant que sonde ;
b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
c) les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride
15 formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

qui est également un objet de l'invention.

Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus.

20 Toutefois, afin de détecter et/ou doser un acide nucléique selon l'invention, l'homme du métier peut également effectuer une étape d'amplification à l'aide d'amorces choisies parmi les séquences selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne également les composés choisis parmi un acide nucléique, un polypeptide, un vecteur, une cellule, ou un anticorps selon
25 l'invention, ou les composés obtenus par les procédés de criblage selon l'invention, à titre de médicament, en particulier pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer, associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N° 1, et/ou à une expression anormale de la protéine correspondant à SEQ ID N° 2.

30 La présente invention se rapporte également à des procédés de criblage et d'identification de produits pouvant interférer dans la cascade de p53, et ainsi induire la réversion tumorale et/ou l'apoptose ou inversement, diminuer les phénomènes d'apoptose.

Cet aspect de la présente invention est basé sur le fait que la protéine TSIP4, objet de la présente demande, se lie à la protéine TSIP2 décrite dans la demande de brevet WO 97/22695, dont le rôle dans la maladie d'Alzheimer a été rapporté.

Dans un premier mode de mise en œuvre, l'invention est dirigée vers un
5 procédé de criblage, de sélection ou d'identification d'un composé interférant avec, réduisant ou inhibant la liaison de TSIP4 à TSIP2, présentant les étapes de :

- a) mise en contact dudit composé avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- b) identification de la diminution et/ou l'inhibition de la liaison
10 entre TSIP4 et TSIP2.

La présente invention a notamment également pour objet un procédé de criblage, de sélection ou d'identification d'un composé pour la diminution et/ou l'inhibition de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), présentant les étapes de :

- a) mise en contact de composés avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- b) identification des composés induisant la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- c) étude des composés identifiés dans l'étape b) dans un modèle
20 permettant de mesurer les phénomènes d'apoptose et/ou répression tumorale ;
- d) identification de la diminution et/ou l'inhibition de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire dans ledit modèle par rapport à un modèle témoin avec lequel ledit composé n'a pas été mis en
25 contact.

Certains modèles permettant d'étudier/mesure l'apoptose et/ou la répression tumorale ont déjà été décrits, et consistent notamment en les modèles *in vitro* décrits par Tellerman *et al.* (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8702-6), Amson *et al.* (1996, Proc. Natl. Acad. SCI ; USA, 93, 3953-7), ou Nemani *et al.* (1996, Proc.
30 Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9039-42).

Afin de déterminer des composés permettant l'augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), il est également possible de combiner différents procédés selon l'invention, il est notamment possible d'obtenir ainsi un

procédé de criblage, de sélection ou d'identification de composés ayant pour fonction une augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), présentant les étapes de :

- 5 a) mise en contact dudit composé avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- b) identification des composés induisant la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2.
- 10 c) mise en contact des composés sélectionnés dans l'étape b) dans un modèle permettant de mesurer les phénomènes d'apoptose et/ou répression tumorale ;
- d) identification de l'augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire dans ledit modèle par rapport à un modèle témoin avec lequel ledit composé n'a pas été mis en contact.

Un tel procédé est donc également un objet de la présente invention.

- 15 La présente invention utilise donc le fait que les protéines TSIP4 et TSIP2 peuvent se lier l'une à l'autre. Il est donc intéressant d'identifier les domaines de chaque protéine qui sont effectivement en contact avec l'autre protéine. En effet, ceci devrait permettre de pouvoir utiliser les peptides ainsi identifiés en tant que leurres ou agonistes des protéines complètes. Ceci peut ainsi permettre de définir
- 20 des composés qui interféreront dans la liaison TSIP4 – TSIP2, et qui pourront éventuellement induire la suppression tumorale et/ou l'apoptose, ou à l'inverse diminuer ces phénomènes.

- 25 De façon plus générale, la présente invention permet l'identification de régions de TSIP4 impliquées dans la liaison avec la protéine TSIP2, par un procédé comportant les étapes de :

- a) mise en contact de peptides issus de la protéine TSIP4 dans un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- 30 b) identification des peptides entraînant la diminution de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 dans ledit système ;

Il est évident que la présente invention permet également la détermination des régions de TSIP2 impliquées dans la liaison avec TSIP4, selon des procédés semblables aux procédés décrits précédemment que ces régions peuvent notamment

être utilisées comme leurres lorsque l'on désire diminuer la répression tumorale et/ou l'apoptose.

Par « région » d'une protéine, on entend notamment des peptides de séquence primaire issue de la séquence primaire de ladite protéine.

5 Ces régions ainsi identifiées peuvent être testées comme les produits décrits ci-dessus pour leurs propriétés dans la régulation de la répression tumorale et/ou l'apoptose.

La présente invention permet donc d'identifier des produits permettant d'interagir avec la liaison TSIP4 – TSIP2, et donc pouvant avoir un intérêt dans la
10 régulation de l'apoptose et/ou la répression tumorale. Toutefois, il est possible que ces produits, pour pouvoir être utilisés pour un traitement thérapeutique, notamment le cancer ou les maladies neuro-dégénératives, nécessitent d'être optimisés, afin d'avoir une activité supérieure, et/ou une toxicité moindre.

En effet, le développement d'un médicament est souvent effectué sur le
15 principe suivant :

- criblage de composés ayant une activité voulue par une méthode appropriée,
- sélection des composés répondant au « cahier des charges »,
- détermination de la structure (notamment la séquence
20 (éventuellement tertiaire) s'il s'agit de peptides, formule et squelette s'il s'agit de composés chimiques) des composés sélectionnés,
- optimisation des composés sélectionnés, par modification de la structure (par exemple par le changement de la conformation stéréochimique (par exemple passage de L en D des acides aminés dans un peptide), ajout de substituants sur les squelettes peptidiques ou chimiques, notamment par greffage de résidus sur
25 le squelette, modification des peptides (voir notamment Gante ("Peptidomimetics", dans Angewandte Chemie-International Edition Engl. 1994, 33. 1699-1720)
30
- passage et criblage des composés ainsi obtenus sur des modèles appropriés qui sont souvent des modèles plus proches de la pathologie étudiée. A ce stade, on utilise notamment souvent des

modèles animaux, en général chez les rongeurs (souris, rats...) ou chez des chiens, voire des primates.

Les modèles animaux qui peuvent être utilisés sont par exemple, pour le cancer, des modèles basés sur des souris immunodéprimées (par exemple *scid/scid*),
5 auxquelles on injecte (notamment en sous-cutané) des cellules tumorales, qui vont mener au développement de tumeurs. On étudie l'efficacité des composés potentiellement anti-tumoraux, par exemple par la mesure de la taille des tumeurs formées.

On peut, pour l'étude des maladies neuro-dégénératives, utiliser le modèle
10 décrit par Amson *et al.* (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 5346-50), qui consiste en des souris déficientes en p53, ou le modèle décrit dans Chen *et al.*, Janus *et al.*, et Morgan *et al.* (2000, Nature, 408 pp. 975-985)

Ainsi, la présente invention a notamment pour objet de permettre l'identification de composés qui pourraient être utilisés pour le traitement du cancer,
15 en ce qu'ils possèdent une activité d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose. Un des objets de la présente invention est donc un procédé comportant les étapes de :

- a) mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, permettant d'identifier des composés ayant une certaine activité
20 d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose,
- b) modification du produit sélectionné à l'étape a),
- c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de répression tumorale et/ou d'apoptose,
- 25 d) identification du produit permettant d'obtenir une activité de répression tumorale et/ou d'apoptose supérieure à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).

L'étape d) peut être remplacée par une étape d'), qui serait :

- d') identification du produit permettant d'obtenir l'effet biologique
30 cherché avec une toxicité moindre dans un modèle animal (lorsque un des modèles utilisés dans l'étape c) est *in vivo*).

Lorsque l'on effectue les tests sur des modèles d'apoptose ou de répression tumorale *in vitro*, on peut par exemple utiliser le modèle K256/KS décrit par

Tellerman *et al.* (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8702-6). On peut également utiliser les cellules M1- LTR, décrites par Amson *et al.* (1996, Proc. Natl. Acad. SCI ; USA, 93, 3953-7), ou les cellules U937/US3-US4, décrites par Nemani *et al.* (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9039-42).

5 Les essais *in vivo* peuvent être réalisés en injectant ces cellules des animaux, notamment des souris immunodéprimées et en étudiant les effets des différents composés testés.

L'homme du métier saura définir les conditions et les seuils nécessaires pour l'identification d'un produit pouvant être utilisé en tant que médicament, selon les
10 exigences réglementaires (notamment de toxicologie), par rapport au bénéfice apporté par le produit ainsi identifié.

De la même façon, l'invention concerne également les procédés d'optimisation des produits réprimant la répression tumorale et/ou l'apoptose, identifiés par les procédés décrits plus haut, et permettant l'identification de
15 produits utilisables comme médicaments.

Ainsi l'invention concerne également un procédé d'identification d'un produit ayant une activité de diminution et/ou d'inhibition de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- 20 a) mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, permettant d'identifier des composés ayant une certaine activité de diminution de la répression tumorale et/ou de l'apoptose,
- b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
- 25 c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de répression tumorale et/ou d'apoptose,
- d) identification du produit permettant d'obtenir une activité de répression tumorale et/ou d'apoptose réduite par rapport à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).

30 L'étape d) peut également être remplacée par une étape d'), qui serait :

- d') identification du produit permettant d'obtenir l'effet biologique cherché avec une toxicité moindre dans un modèle animal (lorsque un des modèles utilisés dans l'étape c) est *in vivo*).

Il s'agit en effet encore de pouvoir obtenir le produit qui présente le meilleur rapport (activité biologique et effet clinique) / (risques potentiels d'utilisation).

Les paramètres à mettre en jeu pour obtenir ces résultats sont tous connus et à la portée de l'homme du métier, désirant développer de nouveaux médicaments, et
5 peuvent être trouvés par exemple dans les directives des organismes tels que l'Agence du Médicament, la Commission Européenne, ou la Federal Drug Agency.

La mise en œuvre des procédés selon la présente invention nécessite des modèles permettant de déterminer la liaison entre TSIP4 et TSIP2, ainsi qu'une mesure aisée des augmentations ou diminution de la quantité de protéine TSIP2 ou
10 p53 dans une cellule eucaryote.

La quantité de protéine TSIP2 ou p53 peut être étudiée par Western Blot, la révélation s'effectuant par utilisation d'un anticorps dirigé contre ladite protéine. De tels anticorps, dirigés vers p53, peuvent être notamment trouvés chez Calbiochem, sous la référence OP09L.

15 Afin de mettre en œuvre les procédés selon l'invention nécessitant l'étude et le criblage sur des cellules mammifères, il peut être avantageux de surexprimer l'une ou l'autre des protéines TSIP4, TSIP2 et p53 dans lesdites cellules, deux d'entre elles, ou les trois ensemble.

Ainsi, il est plus facile de pouvoir étudier les variations dans la quantité de
20 protéine TSIP2 ou de p53, notamment par comparaison des cellules sur lesquelles on teste les composés d'intérêt avec les mêmes cellules, auxquelles on n'ajoute pas les composés que l'on désire cribler.

Il est entendu que l'expression des deux protéines TSIP4, TSIP2, et p53 peut être augmentée par introduction des gènes (notamment les ADNc) codant pour ces
25 protéines dans les cellules, soit placés sur des vecteurs, soit par introduction dans le chromosome.

Lorsque l'on choisit une expression épisomale, ladite cellule mammifère est transfectée par au moins un vecteur choisi parmi un vecteur portant un fragment d'ADN codant pour TSIP4, un vecteur portant un fragment d'ADN codant pour
30 TSIP2, un vecteur portant un fragment d'ADN codant pour p53, un vecteur portant un fragment d'ADN codant pour plus d'une de ces protéines. Ainsi, le même vecteur peut exprimer toutes les protéines, alternativement il est possible d'introduire plusieurs vecteurs.

Il est possible d'utiliser des vecteur permettant l'expression et la purification facile des protéines TSIP4 et TSIP2, par exemple dans des cellules procaryotes (*E. coli*, *B. subtilis*...) ou eucaryotes (levures telles *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*..., cellules mammifères (HeLa, Cos, Hep-2...) ou d'insectes (en utilisant un système à Baculovirus). Ainsi, il peut être avantageux que les protéines possèdent une étiquette à leur extrémité N- ou C-terminale, afin de faciliter la purification. On choisit notamment une étiquette Histidine, ou GST. Ces méthodes sont bien connues de l'homme du métier, qui trouve les plasmides appropriés dans les catalogues de sociétés telles Stratagène.

10 Lorsque l'on met en œuvre les procédés selon l'invention sur des modèles *in vitro*, pour étudier la liaison entre TSIP2 et TSIP4, il existe plusieurs façons d'opérer.

Un protocole utilisable peut être le suivant :

- expression et purification des protéines TSIP4 et TSIP2, par exemple dans des cellules procaryotes (*E. coli*, *B. subtilis*...) ou eucaryotes (levures telles *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*..., cellules mammifères (HeLa, Cos, Hep-2...) ou d'insectes (en utilisant un système à Baculovirus). Il peut être avantageux que les protéines possèdent une étiquette à leur extrémité N- ou C-terminale, afin de faciliter la purification. On choisit notamment une étiquette Histidine, ou GST. Ces méthodes sont bien connues de l'homme du métier, qui trouve les plasmides appropriés dans les catalogues de sociétés telles Stratagène.

- liaison des protéines à des billes appropriées. Lorsque l'on utilise une étiquette GST, on lie les protéines exprimées à des billes de sépharose présentant de la Gluthathione.

25 - préparation de protéines par traduction *in vitro*. Ceci peut aisément être effectué en utilisant des vecteurs commerciaux (par exemple disponibles chez Promega), qui permettent de cloner les ADNc sous le contrôle de promoteurs bien connus (T7 ou T3), et d'utiliser les ARN polymérases appropriées pour produire les ARN, puis d'effectuer l'expression des protéines *in vitro*, en utilisant les troupes disponibles, et en suivant les indications du fabricant.

30 - co-précipitation des protéines, en ajoutant les protéines obtenues par traduction *in vitro* aux billes de sépharose – glutathione sur lesquelles sont fixées les protéines de fusion avec la GST. Après un temps de contact suffisant, on

lave les billes et on effectue une analyse par gel d'électrophorèse en SDS-PAGE, et autoradiographie. L'apparition des bandes correspondant aux deux protéines montre bien la liaison entre celles-ci.

L'utilisation de contrôles appropriés permet ainsi de définir la diminution
5 et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2, par comparaison des quantités de protéines libérées après ajout du composé testé lors de l'étape de coprécipitation avec les quantités de protéines libérées dans les contrôles.

On peut aussi étudier la liaison des protéines en utilisant le système FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui consiste à marquer chacune des
10 protéines avec un résidu approprié, la liaison des deux protéines induisant une réaction entre chacun des deux résidus et l'émission d'une fluorescence aisément détectable.

La présente invention a également pour objet les composés pouvant être obtenu par un procédé selon l'invention, notamment les composés possédant une
15 activité d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, ceux possédant une activité d'inhibition de la liaison TSIP4 – TSIP2, ainsi que ceux possédant une activité de diminution et/ou d'inhibition de la répression tumorale et/ou de l'apoptose.

La présente invention concerne également les séquences peptidiques
20 correspondant à une région de TSIP4 interagissant avec la protéine TSIP2, qui peuvent notamment être identifiées par un procédé selon l'invention.

L'invention concerne aussi les séquences peptidiques correspondant à une région de TSIP2 interagissant avec la protéine TSIP4, qui peuvent notamment être identifiées par un procédé selon l'invention, le procédé permettant d'identifier les
25 séquences peptidiques de TSIP4 interagissant avec TSIP2 pouvant être adapté pour déterminer les séquences peptidiques de TSIP2 interagissant avec TSIP4, notamment en adaptant le protocole *in vitro* développé ci-dessus.

L'invention concerne aussi les séquences nucléotidiques codant pour les séquences peptidiques ainsi identifiées.

30 Il est clair que le terme séquence peptidique ou séquence nucléique ou nucléotidique (ces deux derniers termes étant utilisés de façon indifférente) représentent des séquences isolés, c'est-à-dire hors de leur état naturel, et peuvent notamment être modifiés par le remplacement de leurs unités de bases par des

unités non-naturelles, ou par la modification des liaisons entre les unités de bases (par exemple les phosphorothioates (acide nucléique) ou les Peptid Nucleic Acids)

Il est un objet de l'invention que de permettre l'identification de composés interférant avec la liaison TSIP4 et TSIP2, certains de ces composés pouvant
5 notamment induire des effets sur la cascade de p53. Ainsi, les composés selon l'invention, les séquences peptidiques selon l'invention, ou les séquences nucléotidiques selon l'invention, à titre de médicament, sont également objets de l'invention.

Un composé identifié par une méthode selon l'invention peut être un
10 composé ayant une structure chimique, un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide, ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques.

Parmi les composés chimiques envisagés, ils peuvent contenir un ou
15 plusieurs (notamment 2 ou 3) cycles, aromatique(s) ou non, ayant de 3 à 8 atomes de carbone, ainsi que plusieurs résidus de toute sorte (notamment alkyle inférieur, c'est-à-dire présentant entre 1 à 6 atomes de carbones).

Ces composés, séquences nucléiques, séquences peptidiques, peuvent ainsi être utilisés pour la préparation d'un médicament, destiné notamment au traitement
20 du cancer, ou d'une maladie neuro-dégénérative, selon l'effet pro- ou anti-apoptose/réversion tumorale.

Les inventeurs de la présente demande ont, pour la première fois, mis en évidence le fait que la protéine TSIP4 se lie à la protéine TSIP2. Ainsi, la présente invention concerne également un complexe constitué d'une protéine TSIP4 et d'une
25 protéine TSIP2.

La présente invention concerne également un procédé d'inhibition de la liaison de TSIP4 à TSIP2 dans une cellule, comprenant l'étape de :

a) mise en contact de ladite cellule avec un composé identifié par un procédé selon l'invention, inhibant la liaison TSIP4-TSIP2.

30 Le composé ainsi envisagé peut également être un peptide « leurre » issu de la protéine TSIP4 ou de la protéine TSIP2. Le procédé peut être mis en œuvre *in vitro* ou *in vivo*.

La présente invention est également dirigé vers une méthode pour le traitement d'un cancer, caractérisée en ce que l'on administre, à un patient, un composé identifié selon la présente invention et augmentant l'apoptose et/ou la réversion tumorale.

- 5 Une méthode pour le traitement d'une maladie neuro-dégénérative, consistant à administrer, à un patient, un composé selon la présente invention et diminuant ou inhibant l'apoptose, est également un objet de la présente invention.

Les exemples qui suivent permettent de mieux comprendre les avantages de
10 l'invention et ne doivent pas être considérés comme limitant la portée de l'invention.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : distribution de l'ARNm de TSIP4 dans différents tissus.

- 15 Figure 2 : expression différentielle de TSIP 4 dans le système K562/KS.

EXEMPLES

Exemple 1 : Liaison de TSIP4 et TSIP2

La liaison existant entre TSIP 4 et TSIP 2 a été observée dans un système
20 double-hybride, dérivé du système développé par Finley et Brent (*Interaction trap cloning with yeast*, 169-203, in DNA Cloning, Expression Systems : a practical Approach, 1995, Oxford Universal Press, Oxford), en utilisant la préséniline 1 (TSIP2) en tant qu'appât, et TSIP4 en tant que proie.

Le gène (ADNc) de TSIP2 a été clonée dans le plasmide pEG202 connu de
25 l'homme du métier pour une telle application (promoteur 67-1511, lexA 1538-2227, ADH Ter 2209-2522, pBR remnants 2540-2889, 2 μ ori 2890-4785, YSCNFLP 4923-5729, HIS3 7190-5699, TYIB 7243-7707, RAF_part 7635-7976, squelette pBR 7995-10166, bla 8131-8988).

Le gène (ADNc) TSIP4 a été cloné dans le plasmide pJG4-5, également bien
30 connu de l'homme du métier (promoteur GAL 1-528, cassette de fusion 528-849, ADH Ter 867-1315, 2 μ ori 1371-3365, TRP1 3365-4250, squelette pUC 4264-6422, Ap 4412-5274).

On utilise également le plasmide rapporteur pSH18-34, également connu de l'homme du métier. Ce plasmide est notamment disponible chez Invitrogen, sous le numéro de référence V611-20, et également déjà transformé dans la souche EGY48 (aussi appelée RFY 231), chez le même fournisseur (référence souche seule : C835-
5 00, transformée par pSH18-34 : C836-00)

La liaison a été démontrée dans la souche de levure RFY 231 (décrite dans Finley Jr, *et al*, 1998, Proc Natl Acad Sci USA, 95, 14266-71). Cette souche de levure possède le génotype (MAT α *trp1* Δ ::*hisG his3 ura3-1 leu2*::3Lexop-*LEU2*), et est dérivée de EGY48 (Guris *et al.*, 1993, Cell, 75, 791-803).

10 Le gène rapporteur était le gène LacZ.

On effectue l'étude sur un milieu contenant du galactose, ne contenant pas de leucine, et on étudie la présence de colonies colorées sur ces boîtes.

On a ainsi pu montrer que la protéine TSIP21 se lie à la protéine TSIP4, et que la liaison est sur les 204 acides aminés C-terminaux de la protéine TSIP2.

15

Exemple 2 : analyse de la protéine TSIP4

Il semble que la protéine TSIP 4 possède deux formes alternatives, l'une correspondant à SEQ ID N°2, codée par SEQ ID N°1, l'autre correspondant aux acides aminés 198-400 de SEQ ID N°2, codés par les bases 592 à 1200 de SEQ ID
20 N°1. un peptide signal putatif correspond aux acides aminés 198-243 de SEQ ID N°2 (bases 592 à 729 de SEQ ID N°1).

Les séquences ci-dessus décrites sont aussi objets de l'invention.

La protéine TSIP4 (complète) possède 4 domaines trans-membranaires prédites (acides aminés 224-244, 260-280, 320-340, 350-370), les extrémités N- et
25 C-terminales étant situées dans le cytoplasme. Ces domaines transmembranaires, ainsi que les domaines intra- ou extra-cellulaires sont également objets de l'invention, ainsi que les séquences qui les codent.

Exemple 3 : expression de la protéine TSIP 4

30 L'hybridation d'un Northern Blot de différents tissus humains avec une sonde correspondant à une séquence partielle de TSIP 4 montre l'existence de deux transcrits (environ 1,8 et 6 kb). L'ARNm est trouvé majoritairement dans le cœur, le muscle squelettique, et le cerveau. Il est également présent de façon moins

importante dans le placenta, le pancréas et le rein. Son expression est très faible dans le poumon et quasi inexistante dans le foie (figure 1).

Exemple 4 : expression différentielle de TSIP 4 dans le système K562/KS

5 L'hybridation d'un Northern Blot avec la sonde TSIP4 a montré un signal atténué par rapport à la lignée K562, alors qu'un signal équivalent est obtenu avec la sonde contrôle GAPDH (Figure 2). Le modèle K562/KS a été décrit par Telerman *et al.* (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8702-6).

La protéine TSIP4 est donc réprimée dans un modèle de répression
10 tumorale.

Exemple 5 : expression des protéines de fusion GST

Pour obtenir des protéines de fusion GST, on peut suivre le protocole suivant :

15 Préparation d'une préculture à partir d'une colonie isolée de B121 (DE3), transformée avec le plasmide pGEX-P-1-TSIP4 ou pGEX-P-1-TSIP2, dans un milieu SB avec 100µg/ml d'ampicilline, à 37°C.

Les plasmides sont disponibles chez Amersham Pharmacia Biotech AB.

Les protéines sont les protéines humaines, codées par les ADNc
20 complémentaires correspondant aux séquences SEQ ID N° 1 (TSIP4) et la séquence complète de TSIP2 (GenBank U50957).

Le lendemain, inoculer 250 ml de SB+Amp avec 5 ml de la préculture.

Croissance à 28°C ou 37°C selon la toxicité des protéines pour les bactéries hôtes, jusqu'à une densité optique entre 0,5 et 0,7.

25 Ajout de 0,1 mM IPTG pour induire la synthèse des protéines.

Croissance à 28°C ou 37°C pendant 1h ou 1h30.

Centrifugation 3000 rpm pendant 10 min (1800g, 4°C)

Resuspension du précipité dans 10 ml de tampon A NP40 (NP40 1 % ; Tris
pH 7,4 10 mM ; NaCl 150 mM ; EDTA 1mM ; Glycerol 10% ; DTT 1mM ;
30 Aprotinin 2µg/ml ; Leupeptin 2µg/ml ; Pepstatin 2µg/ml ; AEBSF 1mM).

Sonication 3 fois pendant 15 s à puissance 50, sur glace.

Centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min (18000g, 4°C)

Garder le surnageant à -80°C.

Exemple 6 : protocole à suivre pour la liaison des protéines de fusion aux billes de sepharose-glutathione

- Ajout de 2 ml de surnageant à 200 µl de billes (préparées après 3 rinçages dans le PBS, 1 rinçage dans le tampon A NP40, resuspension à 50 % (poids par volume) dans le tampon A NP40, centrifugation à 3000 rpm à chaque fois).

Les billes Glutathione-sepharose 4B sont disponibles chez Amersham Pharmacia Biotech AB, sous le numéro 17.0756.01.

Remuer doucement pendant au moins 1 heure à 4°C.

- 10 Rincer les billes 3 fois dans le tampon A NP40 sans inhibiteur de protéase.

Resuspendre les billes dans 1 ml de tampon A NP40 avec inhibiteur de protéase.

- Pour l'analyse par électrophorèse SDS-PAGE, prendre 20 à 40 µl des billes resuspendues, centrifuger pendant 5 min, écarter le surnageant, resuspendre les billes dans 10 µl de tampon de charge de X, chauffer à 97°C pendant 7 min. Charger sur gel et analyser après révélation par bleu de Coomassie, pour normaliser la quantité des protéines de fusion à utiliser.

Exemple 7 : protocole pour la traduction de protéines *in vitro*

- 20 Le kit TNT Coupled Reticulocyte Lysate System de Promega est utilisé avec les ARN polymérase T7 ou T3 en fonction du vecteur utilisé pour traduire et exprimer les protéines (T7 pour AIP1 et TSIP4 1, T3 pour TSIP2). Le kit est utilisé selon les instructions du fabricant (Référence L4610)

Les protéines incorporent de la méthionine S³⁵ (Amersham Pharmacia).

- 25 Les produits obtenus *in vitro* sont analysés par électrophorèse SDS-PAGE.

Après électrophorèse, le gel est placé dans du tampon de fixation (5 % de méthanol, 15 % d'acide acétique, 80 % d'eau) pendant une 1/2 heure et le signal est amplifié par immersion du gel dans le produit Amplify de Amersham Pharmacia (Ref : NAMP100).

- 30 Un film Kodak Biomax MR est alors exposé sur le gel séché pendant une durée variant d'une heure à une semaine, puis développé.

Exemple 8 : protocole pour la co-précipitation des protéines

30 µl des billes de sépharose- glutathione couplés aux protéines de fusion GST, après normalisation des quantités, sont rincés dans le tampon B (NP40 1 %, TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, leupeptine 2 µl/ml, aprotinine 1 %, ABESF 1 mM).

- 5 On ajoute ensuite 5 à 10 µl du produit de traduction *in vitro* tel qu'obtenu dans l'exemple 3, en fonction de la quantité du produit observé par autoradiographie.

Après une nuit de contact, les billes sont rincées 10 fois avec du tampon A NP 40, sans antiprotéases.

On analyse par SDS-PAGE et autoradiographie.

- 10 On peut ainsi montrer la liaison entre les protéines TSIP4 et TSIP2.

Exemple 9 : protocole pour le criblage de composés interférant avec la liaison TSIP4 – TSIP2

- 15 On effectue les essais décrits dans les exemples 5 à 8, en ajoutant les composés que l'on désire étudier à l'étape de l'exemple 8, et on compare avec les résultats obtenus lorsque les composés ne sont pas ajoutés.

Références

- Buckholz, (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 538.
- Carter, (1993) Curr. Op. Biotechnology 3, 533.
- Duck et al. (1990), Biotechniques, 9, 142.
- 5 Edwards et Aruffo (1993), Curr. Op. Biotechnology, 4, 558.
- Epstein (1992) Médecine/Sciences, 8, 902.
- Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874.
- Kievitis et al. (1991), J. Virol. Methods, 35, 273.
- Köhler et Milstein. (1975) Nature 256, 495.
- 10 Kwoh, et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173.
- Landegren et al. (1988) Science 241, 1077.
- Luckow (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 564.
- Matthews et al. (1988), Anal. Biochem., 169, 1-25.
- Miele et al. (1983), J. Mol. Biol., 171, 281.
- 15 Neddleman et Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443
- Olins et Lee (1993), Curr. Op. Biotechnology 4 : 520.
- Perricaudet et al. (1992). La Recherche 23 : 471.
- Pearson et Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444
- Rohlmann et al. (1996) Nature Biotech. 14 : 1562.
- 20 Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- Sambrook et al. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.
- Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. 2 : 482
- 25 Stewart et Yound (1984), Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ème éd., (1984).
- Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. In Kucherlapati R., ed. Gene Transfer, New York, Plenum Press, 149-187.
- Walker (1992), Nucleic Acids Res. 20 : 1691.

Revendications

1. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :
- 5 a) SEQ ID N° 1 ;
- b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de SEQ ID N° 1 ;
- c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence
- 10 définie en a) ou b) ;
- d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) ;
- e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).
- 15
2. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué d'une séquence choisie dans le groupe constitué de SEQ ID N° 1, la séquence complémentaire de SEQ ID N° 1 et la séquence d'ARN correspondant à SEQ ID N° 1.
- 20
3. Acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés de la protéine SEQ ID N° 2.
- 25
4. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
- a) un polypeptide correspondant à SEQ ID N° 2 ;
- b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
- 30 c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'homologie avec ledit polypeptide de a) ;

- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

5

5. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ou codant pour un polypeptide selon la revendication 4.

10

6. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 5.

7. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 6.

15

8. Utilisation *in vitro* d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 en tant que sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

20

9. Utilisation *in vitro* d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 comme oligonucléotide sens ou antisens.

10. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 pour la production d'un polypeptide recombinant.

25

11. Procédé d'obtention d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 6 dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

30

12. Polypeptide recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 11.

13. Anticorps monoclonal ou polyclonal caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 4 ou 12.

14. Procédé de détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 12, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 13 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

15 10 15. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 13 ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

20 16. Méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène.

25 17. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.

18. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 4 ou 12, ou un anticorps selon la revendication 13.

30

19. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

5

20. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon biologique à l'aide d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'une des
10 revendications 1 à 2.

21. Procédé de criblage de composés capables de se fixer à un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un polypeptide selon l'une des revendications 4 ou 12, d'une cellule selon
15 la revendication 6, ou d'un mammifère selon la revendication 7, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit polypeptide.

22. Procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo*
20 avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, d'une cellule selon la revendication 6, ou d'un mammifère selon la revendication 7, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit acide nucléique

25

23. Utilisation d'un composé obtenu par un procédé selon l'une des revendications 21 ou 22, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer.

30

24. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi

- a) un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ;
- b) un polypeptide selon l'une des revendications 4 ou 12 ;
- c) un vecteur selon la revendication 5 ;

- d) une cellule selon la revendication 6 ;
 - e) un anticorps selon la revendication 13,
- à titre de médicament.

- 5 25. Composé selon la revendication 24, pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer associé à la présence d'au moins une mutation ou d'une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1.
- 10 26. Procédé d'identification d'un composé inhibant la liaison de TSIP4 à TSIP2, présentant les étapes de :
- a) mise en contact dudit composé avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
 - b) identification de la diminution et/ou l'inhibition de la liaison
- 15 entre TSIP4 et TSIP2.
27. Procédé d'identification d'un composé pour la diminution et/ou l'inhibition de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), présentant les étapes de :
- 20 a) mise en contact de composés avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
 - b) identification des composés induisant la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
 - c) mise en contact des composés identifiés dans l'étape b) dans un
- 25 modèle permettant de mesurer les phénomènes d'apoptose et/ou répression tumorale ;
- d) identification de la diminution et/ou l'inhibition de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire dans ledit modèle par rapport à un modèle témoin avec lequel ledit composé n'a pas été mis en
- 30 contact.

28. Procédé d'identification d'un composé pour l'augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), présentant les étapes de :

- 5
- a) mise en contact de composés avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
 - b) identification des composés induisant la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
 - 10 c) mise en contact des composés identifiés dans l'étape b) dans un modèle permettant de mesurer les phénomènes d'apoptose et/ou répression tumorale ;
 - d) identification de l'augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire dans ledit modèle par rapport à un modèle témoin avec lequel ledit composé n'a pas été mis en contact.

29. Procédé d'identification des régions de TSIP4 impliquées dans la liaison avec la protéine TSIP2, comportant les étapes de :

- 15
- a) mise en contact de peptides issus de la protéine TSIP4 dans un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
 - b) identification des peptides entraînant la diminution de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 dans ledit système ;

20 30. Procédé d'identification d'un produit ayant une activité d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- 25
- a) mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 26 ou 28,
 - b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
 - c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de répression tumorale et/ou d'apoptose,
 - 30 d) identification du produit permettant d'obtenir une activité de répression tumorale et/ou d'apoptose supérieure à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).

31. Procédé d'identification d'un produit ayant une activité de diminution et/ou d'inhibition de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- 5 a) mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 26 ou 27,
- b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
- 10 c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de répression tumorale et/ou d'apoptose,
- d) identification du produit permettant d'obtenir une activité de répression tumorale et/ou d'apoptose réduite par rapport à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).

15 32. Utilisation d'un composé identifié par un procédé selon l'une des revendications 26, 28, ou 30, possédant une activité d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

20 33. Utilisation d'un composé identifié par un procédé selon l'une des revendications 26, 27, ou 31, possédant une activité de diminution et/ou d'inhibition de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une maladie neuro-dégénérative.

25 34. Séquence peptidique correspondant à une région de TSIP4 pouvant être identifiée par un procédé selon la revendication 29.

 35. Séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique selon la revendication 34.

30

 36. Séquence peptidique selon la revendication 34, ou séquence nucléotidique selon la revendication 35 à titre de médicament.

37. Utilisation d'une séquence peptidique selon la revendication 34, ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 35 pour la préparation d'un médicament.

5 38. Complexe constitué d'une protéine TSIP4 et d'une protéine TSIP2.

39. Procédé d'inhibition de la liaison TSIP4 – TSIP2 dans une cellule *in vitro*, comprenant l'étape de :

10 a) mise en contact de ladite cellule avec un composé identifié par un procédé selon la revendication 26.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau International le 22 Mai 2002 (22.05.02);
revendications originales 1-39 remplacées par les revendications modifiées 1-38 (8 pages)]

1. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :
 - 5 a) SEQ ID N° 1 ;
 - b) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ;
 - c) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ;
 - 10 d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).
2. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué d'une séquence choisie dans le groupe constitué de SEQ ID N° 1, la séquence complémentaire de SEQ ID N° 1 et la séquence d'ARN correspondant à SEQ ID N° 1.
 - 15
3. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
 - 20 a) un polypeptide correspondant à SEQ ID N° 2 ;
 - b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
 - c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b),
 - 25 comportant au moins 80 % d'homologie avec ledit polypeptide de a) ;
 - d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
 - e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a),
 - 30 b) ou c).

4. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 2 ou codant pour un polypeptide selon la revendication 3.

5 5. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 4.

6. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 5.

10

7. Utilisation *in vitro* d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 2 en tant que sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

15 8. Utilisation *in vitro* d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 2 comme oligonucléotide sens ou antisens.

9. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 2 pour la production d'un polypeptide recombinant.

20

10. Procédé d'obtention d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 5 dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

25 11. Polypeptide recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 10.

12. Anticorps monoclonal ou polyclonal caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 3 ou 11.

30

13. Procédé de détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 3, ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 12 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

5 14. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 12 ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- 10 c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

15 15. Méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène.

20 16. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléique selon l'une des revendications 1 à 2.

25 17. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 3 ou 11, ou un anticorps selon la revendication 12.

 18. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1 et 2, marqué ;
- 30 b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

19. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon biologique à l'aide d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'une des
5 revendications 1 et 2.

20. Procédé de criblage de composés capables de se fixer à un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un polypeptide selon l'une des revendications 3 ou 11, d'une cellule selon
10 la revendication 5, ou d'un mammifère selon la revendication 6, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit polypeptide.

21. Procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo*
15 avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2, d'une cellule selon la revendication 5, ou d'un mammifère selon la revendication 6, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit acide nucléique
20

22. Utilisation d'un composé obtenu par un procédé selon l'une des revendications 20 ou 21, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer.

23. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi
25 a) un acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2 ;
b) un polypeptide selon l'une des revendications 3 ou 11 ;
c) un vecteur selon la revendication 4 ;
d) une cellule selon la revendication 5 ;
30 e) un anticorps selon la revendication 12,
à titre de médicament.

24. Composé selon la revendication 23, pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un cancer associé à la présence d'au moins une mutation ou d'une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1.

5

25. Procédé d'identification d'un composé inhibant la liaison de TSIP4 à TSIP2, présentant les étapes de :

- a) mise en contact dudit composé avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- 10 b) identification de la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2.

26. Procédé d'identification d'un composé pour la diminution et/ou l'inhibition de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), présentant
15 les étapes de :

- a) mise en contact de composés avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- b) identification des composés induisant la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- 20 c) mise en contact des composés identifiés dans l'étape b) dans un modèle permettant de mesurer les phénomènes d'apoptose et/ou répression tumorale ;
- d) identification de la diminution et/ou l'inhibition de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire dans ledit modèle par rapport à
25 un modèle témoin avec lequel ledit composé n'a pas été mis en contact.

27. Procédé d'identification d'un composé pour l'augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire (apoptose), présentant les étapes de :

- 30 a) mise en contact de composés avec un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- b) identification des composés induisant la diminution et/ou l'inhibition de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;

- 5 c) mise en contact des composés identifiés dans l'étape b) dans un modèle permettant de mesurer les phénomènes d'apoptose et/ou répression tumorale ;
- d) identification de l'augmentation de la répression tumorale et/ou la mort cellulaire dans ledit modèle par rapport à un modèle témoin avec lequel ledit composé n'a pas été mis en contact.

28. Procédé d'identification des régions de TSIP4 impliquées dans la liaison avec la protéine TSIP2, comportant les étapes de :

- 10 a) mise en contact de peptides issus de la protéine TSIP4 dans un système permettant la détermination *in vitro* de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 ;
- b) identification des peptides entraînant la diminution de la liaison entre TSIP4 et TSIP2 dans ledit système ;

15

29. Procédé d'identification d'un produit ayant une activité d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- 20 a) mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 25 ou 27,
- b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
- 25 c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de répression tumorale et/ou d'apoptose,
- d) identification du produit permettant d'obtenir une activité de répression tumorale et/ou d'apoptose supérieure à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).

- 30 30. Procédé d'identification d'un produit ayant une activité de diminution et/ou d'inhibition de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- 5 a) mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 26 ou 26,
b) modification du produit sélectionné à l'étape a) notamment par greffage de résidus sur le squelette chimique,
c) test du produit modifié dans l'étape b) dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo*, sur des modèles pertinents de répression tumorale et/ou d'apoptose,
d) identification du produit permettant d'obtenir une activité de répression tumorale et/ou d'apoptose réduite par rapport à l'activité obtenue pour le produit sélectionné à l'étape a).
- 10

31. Utilisation d'un composé identifié par un procédé selon l'une des revendications 25, 27, ou 29, possédant une activité d'augmentation de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

15

32. Utilisation d'un composé identifié par un procédé selon l'une des revendications 25, 26, ou 30, possédant une activité de diminution et/ou d'inhibition de la répression tumorale et/ou de l'apoptose, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une maladie neuro-dégénérative.

20

33. Séquence peptidique correspondant à une région de TSIP4 pouvant être identifiée par un procédé selon la revendication 28.

25 34. Séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique selon la revendication 33.

35. Séquence peptidique selon la revendication 33, ou séquence nucléotidique selon la revendication 34 à titre de médicament.

30

36. Utilisation d'une séquence peptidique selon la revendication 33, ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 34 pour la préparation d'un médicament.

37. Complexe constitué d'une protéine TSIP4 et d'une protéine TSIP2.

38. Procédé d'inhibition de la liaison TSIP4 – TSIP2 dans une cellule *in*
5 *vitro*, comprenant l'étape de :
- a) mise en contact de ladite cellule avec un composé identifié par un procédé selon la revendication 25.

1 / 2

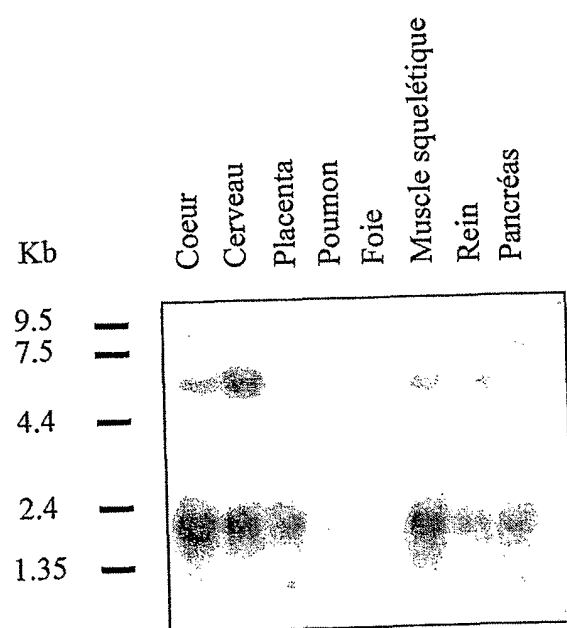


Fig. 1

2 / 2

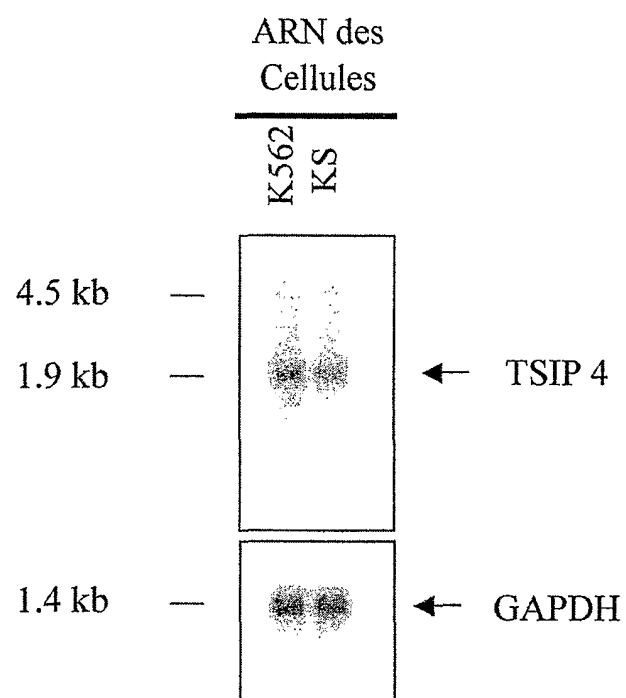


Fig. 2

LISTE DE SEQUENCES

<110> MOLECULAR ENGINES LABORATORIES

<120> Gène impliqué dans la régulation de l'apoptose

<130> D19281

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1203

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSIP4

<400> 1

```

atggggaaga atcctgtgcg tcctccacga gctcttcac ctgtgccaaag tcaagatgat 60
attccactta gtcgtcctaa gaaaaagaag ccagaacaa aaaacacacc agcaagtgtc 120
tctttggaag gccttgctca gactgctggt cgaaggccct ctgagggcaa tgagccatca 180
actaaagaac tcaaagagca ccagaggct cctgttcaaa gaagacagaa aaagacaagg 240
ctacctcttg aattggagac ttctccacc caaagaagt catctagttc atctttatta 300
cgaaatgaaa atggtattga tgcggagcca gctgaggagg cagttattca aaaacctcgg 360
aggaagacaa agaaaacca gccagcagaa ttacagtatg ccaatgagct aggagtagaa 420
gatgaagaca taatcactga tgagcaaact actgtggaac agcagtctgt attcactgca 480
cccactggca ttagccagcc tgtaggcaaa gtatttggg aaaaaagccg gagattccag 540
gctgctgata gttcagagtt gataaagacc acagaaaaca tagatgtgtc aatggacgtg 600
aagccttcct ggaccaccag agatgtggca cttacagtgc accgggcttt caggatgatt 660
gggtctcttt ctcattgatt cttggctggc tgtgctgtgt ggaatattgt tgtgatata 720
gttctagcag gagatcagct atccaacctc tcaaaccttc tgcaacaata caagacctta 780
gcgtatccat tccagagtct tctgtacttg cttttggctc tgagtacaat ttcagctttt 840
gacaggattg actttgctaa aatatcagta gcaatccgaa attttttggc cctggatcct 900
acagctttag catctttctt gtactttact gctcttatac tatctctgag tcagcaaatg 960
acaagtgaca gaatccacct ttacacacct tcttctgtta atggtagcct ctgggaagca 1020
ggaattgagg aacagattct ccagccatgg attgtggtga atctcgtggg ggctcttctg 1080
gttggtattt cttggctatt tttgtcttat aggccaggca tggatcttag tgaagagtta 1140
atgttctcct cagaggtgga agaatatcct gataaagaga aagaaatcaa agcctcttca 1200
taa
1203

```

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSIP4

<400> 2

```

Met Gly Lys Asn Pro Val Arg Pro Pro Arg Ala Leu Pro Pro Val Pro
  1              5              10              15

Ser Gln Asp Asp Ile Pro Leu Ser Arg Pro Lys Lys Lys Lys Pro Arg
          20              25              30

Thr Lys Asn Thr Pro Ala Ser Ala Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Thr
      35              40              45

Ala Gly Arg Arg Pro Ser Glu Gly Asn Glu Pro Ser Thr Lys Glu Leu
      50              55              60

```

Lys Glu His Pro Glu Ala Pro Val Gln Arg Arg Gln Lys Lys Thr Arg
 65 70 75 80
 Leu Pro Leu Glu Leu Glu Thr Ser Ser Thr Gln Lys Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Leu Leu Arg Asn Glu Asn Gly Ile Asp Ala Glu Pro Ala Glu
 100 105 110
 Glu Ala Val Ile Gln Lys Pro Arg Arg Lys Thr Lys Lys Thr Gln Pro
 115 120 125
 Ala Glu Leu Gln Tyr Ala Asn Glu Leu Gly Val Glu Asp Glu Asp Ile
 130 135 140
 Ile Thr Asp Glu Gln Thr Thr Val Glu Gln Gln Ser Val Phe Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Thr Gly Ile Ser Gln Pro Val Gly Lys Val Phe Val Glu Lys Ser
 165 170 175
 Arg Arg Phe Gln Ala Ala Asp Arg Ser Glu Leu Ile Lys Thr Thr Glu
 180 185 190
 Asn Ile Asp Val Ser Met Asp Val Lys Pro Ser Trp Thr Thr Arg Asp
 195 200 205
 Val Ala Leu Thr Val His Arg Ala Phe Arg Met Ile Gly Leu Phe Ser
 210 215 220
 His Gly Phe Leu Ala Gly Cys Ala Val Trp Asn Ile Val Val Ile Tyr
 225 230 235 240
 Val Leu Ala Gly Asp Gln Leu Ser Asn Leu Ser Asn Leu Leu Gln Gln
 245 250 255
 Tyr Lys Thr Leu Ala Tyr Pro Phe Gln Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Leu
 260 265 270
 Ala Leu Ser Thr Ile Ser Ala Phe Asp Arg Ile Asp Phe Ala Lys Ile
 275 280 285
 Ser Val Ala Ile Arg Asn Phe Leu Ala Leu Asp Pro Thr Ala Leu Ala
 290 295 300
 Ser Phe Leu Tyr Phe Thr Ala Leu Ile Leu Ser Leu Ser Gln Gln Met
 305 310 315 320
 Thr Ser Asp Arg Ile His Leu Tyr Thr Pro Ser Ser Val Asn Gly Ser
 325 330 335
 Leu Trp Glu Ala Gly Ile Glu Glu Gln Ile Leu Gln Pro Trp Ile Val
 340 345 350
 Val Asn Leu Val Val Ala Leu Leu Val Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu
 355 360 365
 Ser Tyr Arg Pro Gly Met Asp Leu Ser Glu Glu Leu Met Phe Ser Ser
 370 375 380
 Glu Val Glu Glu Tyr Pro Asp Lys Glu Lys Glu Ile Lys Ala Ser Ser
 385 390 395 400

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/04199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/63 C12N5/10 A01K67/027
 C12Q1/68 C12P21/00 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/68
 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00

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 7 C07K

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)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EM_EST 'Online! EMBLA; 25 August 2000 (2000-08-25) NIH-MGC: "601493434F1 NIH_MGC_70 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3895616 5', mRNA sequene" retrieved from EBI, accession no. BE621274 Database accession no. BE621274 XP002176703 the whole document --- -/--	1, 3



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

15 April 2002

Date of mailing of the international search report

24/04/2002

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

Ceder, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/04199

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EM_EST 'Online! EMBL; 25 August 2000 (2000-08-25) NIH-MGC: "601280939F1 NIH_MGC_39 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3622856 5', mRNA sequence" retrieved from EBI, accession no. BE615453 Database accession no. BE615453 XP002176704 the whole document ---	1,3
X	DATABASE EM_EST 'Online! EMBL; 10 October 2000 (2000-10-10) SONG ET AL.: "Homo sapiens cDNA clone:NPCAPE06, 5'end, expressed in human pituitary" retrieved from EBI, accession no. AV748885 Database accession no. AV748885 XP002176705 the whole document ---	1,3
A	WO 97 22695 A (FONDATION JEAN DAUSSET CEPH ;TALERMAN ADAM (FR); AMSON ROBERT (FR)) 26 June 1997 (1997-06-26) cited in the application the whole document ---	1-39
A	WO 00 08147 A (FONDATION JEAN DAUSSET CEPH ;TELERMAN ADAM (FR); AMSON ROBERT (FR)) 17 February 2000 (2000-02-17) cited in the application the whole document ---	1-39
A	ROPERCH J P ET AL: "Inhibition of presenilin-1 expression is promoted by p53 and p21/WAF1 and results in apoptosis and tumor suppression" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 835-838, XP002104344 ISSN: 1078-8956 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/04199

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9722695	A	26-06-1997	FR 2742766 A1	27-06-1997
			FR 2747691 A1	24-10-1997
			CA 2240449 A1	26-06-1997
			EP 0868512 A2	07-10-1998
			WO 9722695 A2	26-06-1997
			JP 2000502893 T	14-03-2000
WO 0008147	A	17-02-2000	FR 2782085 A1	11-02-2000
			EP 1105483 A1	13-06-2001
			WO 0008147 A1	17-02-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 01/04199

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7	C12N15/12	C07K14/47	C12N15/63	C12N5/10	A01K67/027
	C12Q1/68	C12P21/00	C07K16/18	G01N33/53	G01N33/68
	A61K38/17	A61K39/395	A61K48/00		

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 7 C07K

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 réalisable, termes de recherche utilisés)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE EM_EST 'en ligne! EMBLA; 25 août 2000 (2000-08-25) NIH-MGC: "601493434F1 NIH_MGC_70 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3895616 5', mRNA sequene" retrieved from EBI, accession no. BE621274 Database accession no. BE621274 XP002176703 le document en entier --- -/--	1,3



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

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/04/2002

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

Ceder, 0

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCI/FR 01/04199

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE EM_EST 'en ligne! EMBL; 25 août 2000 (2000-08-25) NIH-MGC: "601280939F1 NIH_MGC_39 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3622856 5', mRNA sequence" retrieved from EBI, accession no. BE615453 Database accession no. BE615453 XP002176704 le document en entier ---	1,3
X	DATABASE EM_EST 'en ligne! EMBL; 10 octobre 2000 (2000-10-10) SONG ET AL.: "Homo sapiens cDNA clone: NPCAPE06, 5'end, expressed in human pituitary" retrieved from EBI, accession no. AV748885 Database accession no. AV748885 XP002176705 le document en entier ---	1,3
A	WO 97 22695 A (FONDATION JEAN DAUSSET CEPH ;TALERMAN ADAM (FR); AMSON ROBERT (FR)) 26 juin 1997 (1997-06-26) cité dans la demande le document en entier ---	1-39
A	WO 00 08147 A (FONDATION JEAN DAUSSET CEPH ;TELERMAN ADAM (FR); AMSON ROBERT (FR)) 17 février 2000 (2000-02-17) cité dans la demande le document en entier ---	1-39
A	ROPERCH J P ET AL: "Inhibition of presenilin-1 expression is promoted by p53 and p21/WAF1 and results in apoptosis and tumor suppression" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 7, juillet 1998 (1998-07), pages 835-838, XP002104344 ISSN: 1078-8956 -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/04199

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9722695 A	26-06-1997	FR 2742766 A1	27-06-1997
		FR 2747691 A1	24-10-1997
		CA 2240449 A1	26-06-1997
		EP 0868512 A2	07-10-1998
		WO 9722695 A2	26-06-1997
		JP 2000502893 T	14-03-2000
WO 0008147 A	17-02-2000	FR 2782085 A1	11-02-2000
		EP 1105483 A1	13-06-2001
		WO 0008147 A1	17-02-2000