

(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
12 mai 2005 (12.05.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/042004 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 38/17, A61P 35/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/002751

(22) Date de dépôt international :
26 octobre 2004 (26.10.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0312572 28 octobre 2003 (28.10.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75106 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BLACHE, Philippe** [FR/FR]; 300, impasse de la Combe, F-30000 Nîmes (FR). **JAY, Philippe** [FR/FR]; 65, chemin du Goulet, F-34980 Combaillaux (FR).

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.; Cabinet Orès, 36, rue de Saint-Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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: USE OF TRANSCRIPTION FACTOR SOX9 FOR THE TREATMENT OF TUMORS EXPRESSING CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN

(54) Titre : UTILISATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SOX9 POUR LE TRAITEMENT DE TUMEURS EXPRIMANT L'ANTIGÈNE CARCINOEMBRYONNAIRE

(57) Abstract: The invention relates to the use of a nucleic acid sequence coding for protein SOX9 in order to obtain a medicament. Said medicament can be used to reduce the expression of carcinoembryonic antigen (ACE) and to reduce tumoral progression and the development of metastases, in the treatment of tumors expressing carcinoembryonic antigen, particular cancer of the colon.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique codant pour la protéine SOX9 pour l'obtention d'un médicament. Ledit médicament est utilisable pour diminuer l'expression de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) et diminuer la progression tumorale et le développement de métastases, dans le cadre du traitement de tumeurs exprimant l'antigène carcinoembryonnaire, et notamment du cancer du colon.



WO 2005/042004 A1

**UTILISATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SOX9 POUR LE
TRAITEMENT DE TUMEURS EXPRIMANT L'ANTIGENE
CARCINOEMBRYONNAIRE.**

La présente invention est relative à
5 l'utilisation du facteur de transcription SOX9 dans le cadre
du traitement de tumeurs exprimant l'antigène
carcinoembryonnaire (ACE), et notamment du cancer du colon.

L'antigène carcinoembryonnaire est une
glycoprotéine membranaire apparentée à la superfamille des
10 immunoglobulines. Il est exprimé en très faible quantité dans
la muqueuse du colon normal, mais est surexprimé dans les
carcinomes colo-rectaux, ainsi que dans d'autres carcinomes
d'origine endodermique, tels que les carcinomes du poumon, du
sein, de la prostate, ou des ovaires. La détermination des
15 concentrations sanguines en ACE est utilisée comme outil de
diagnostic et de suivi thérapeutique de ces tumeurs.

Du fait de sa surexpression à la surface des
cellules tumorales, l'ACE constitue également une cible pour
l'immunothérapie antitumorale. Des anticorps dirigés contre
20 cet antigène sont utilisés pour éliminer les cellules
tumorales qui l'expriment.

Il apparaît également que l'antigène
carcinoembryonnaire est impliqué dans la progression tumorale
et dans le développement de métastases. WIRTH et al. (Clin.
25 Exp. Metastasis 19 :155-160, 2002) ont observé qu'une
diminution de 50% de l'expression de l'ACE dans des cellules
de cancer du colon de la lignée HT 29 augmente la mort
cellulaire par apoptose, et diminue la capacité de ces
cellules à développer des tumeurs et à former des métastases
30 chez des souris dépourvues de défense immunitaires.

Il apparaît donc souhaitable de disposer de
moyens de diminuer l'expression de l'antigène
carcinoembryonnaire dans les cellules tumorales, afin de
permettre d'inhiber la croissance tumorale et de diminuer le
35 développement de métastases.

Sox9 est un facteur de transcription de la
famille SOX (pour : SRY-related HMG box), possédant un
domaine de liaison à l'ADN de type HMG (High-Mobility Group).

Il est fortement exprimé dans les chondrocytes, et est impliqué dans la chondrogenèse, notamment en augmentant l'expression du collagène de type II. Il apparaît également impliqué dans la différenciation sexuelle, et est exprimé de manière importante au cours du développement des testicules. Les mutations entraînant un déficit ou un dysfonctionnement de SOX9 se traduisent par une dysplasie campomélique, qui se manifeste par des déformations squelettiques importantes, et une inversion de sexe. AFONJA et al., (Oncogène 21 :7850-7860, 2002) ont récemment rapporté que SOX9 était également exprimé dans les tissus mammaires et rénaux, et que son ~~expression dans des cellules tumorales de cancer mammaire-œstrogène~~ dépendant sensibles à l'acide rétinoïque (lignée T-47D) était augmentée par des agonistes des récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs), entraînant une inhibition de la croissance cellulaire en retardant la transition entre la phase G0-G1 et la phase S du cycle cellulaire.

Les Inventeurs ont observé que le gène SOX9 est fortement exprimé dans tout l'épithélium du tube digestif, depuis l'estomac jusqu'au rectum, ainsi que dans les cellules tumorales humaines d'origine intestinale et pulmonaire. Ils ont entrepris d'étudier le rôle de ce facteur de transcription dans ces tissus. Dans ce cadre, ils ont transfecté des cellules provenant d'un adénocarcinome intestinal humain par une séquence d'ADN exprimant la protéine SOX9, et ont constaté que la surexpression de SOX9 qui en résultait entraînait une inhibition de l'expression de l'antigène carcinoembryonnaire, et une diminution de la croissance cellulaire.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation du facteur de transcription SOX9, ou d'un polynucléotide codant pour ledit facteur de transcription, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de tumeurs exprimant l'antigène carcinoembryonnaire, à l'exception des carcinomes mammaires sensibles aux agonistes des récepteurs de l'acide rétinoïque.

Selon un mode de mise en œuvre préférée de la présente invention, ledit médicament est destiné au traitement du cancer du colon.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, dans le cas de l'utilisation directe du polypeptide SOX9, on peut coupler ledit polypeptide à un peptide transducteur, lui conférant la capacité de pénétrer à l'intérieur d'une cellule vivante, indépendamment de la présence de transporteurs ou de récepteurs spécifiques (Cf. par exemple : LINDGREN et al., Trends Pharmacol. Sci. 21(3) : 99-102, 2000 ; SCHWARZE et DOWDY, Trends Pharmacol. Sci. 21(2) : 45-48, 2000 ; SCHWARZE et al., ~~Trends Cell. Biol. 10(7) : 290-295, 2000 ;~~ PROCHIANZ, Curr. Opin. Cell Biol. 12(4) : 400-406, 2000 ; TAKENOBU et al., Mol. Cancer Ther. 1(12) : 1043-1049, 2002).

Pour la mise en œuvre de la présente invention dans le cas de l'utilisation d'un polynucléotide codant pour SOX9, on peut employer les vecteurs et les méthodes de transfert de gènes habituellement utilisés en thérapie génique, qui sont connus en eux-mêmes.

Classiquement, ledit polynucléotide est placé dans une cassette d'expression, sous contrôle de séquences appropriées permettant le contrôle de son expression dans les cellules cibles visées. Avantageusement, on choisira des séquences de contrôle de l'expression, et notamment un promoteur permettant une expression préférentielle dans les cellules exprimant l'antigène carcinoembryonnaire. A titre d'exemples, on citera le promoteur de l'antigène carcinoembryonnaire (OKABE et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129(6) : 367-373, 2003 ; GOTO et al., Int. J. Cancer 94(3) : 414-419, 2001), une séquence consensus sur laquelle se fixe le facteur de transcription TCF-4 (KWONG et al., Oncogene 21(54) : 8340-8346, 2002 ; LIPINSKI et al., Mol. Ther. 4(4) : 365-371, 2001), et le promoteur de la cyclooxygenase-2 (YAMAMOTO et al., Mol. Ther. 3 : 385-394, 2001).

La construction ainsi obtenue peut être administrée par l'une quelconque des méthodes, connues en elle-mêmes, qui sont utilisées en thérapie génique. A titre

d'exemples, on citera l'injection directe d'ADN nu, l'administration d'ADN encapsulé dans des liposomes ou associé à des protéines, ou l'utilisation de vecteurs viraux, par exemple de vecteurs dérivés de rétrovirus, de lentivirus, d'adénovirus, ou de virus associés aux adénovirus.

Avantageusement, on pourra choisir un vecteur modifié pour cibler préférentiellement les cellules exprimant l'ACE, tels que ceux décrits par exemple par KHARE et al. (Cancer Res. 61, 370-375, 2001), ou par MARTIN et al. (J. Virol. 77(4) : 2753-2756, 2003).

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, on peut utiliser SOX9, ou un polynucléotide codant pour ledit facteur de transcription en association avec un autre traitement anti-tumoral.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément d'information qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant la mise en évidence des propriétés de SOX9 sur des cellules cancéreuses intestinales exprimant l'antigène carcinoembryonnaire.

EXEMPLE 1 : EXPRESSION DE SOX9 DANS L'EPITHELIUM DU TUBE DIGESTIF

Profil d'expression de sox9 dans l'intestin de souris

5 µg/puits d'extrait protéique mesurés par la méthode de Bradford et provenant de différents tissus du tube digestif (duodénum, jéjunum, iléum, cæcum, colon central, colon terminal) ont été déposés sur gel, puis analysés par transfert immunoélectrophorétique à l'aide d'anticorps dirigés contre SOX9. La quantité de protéine totale déposée sur le gel a été contrôlée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la β -actine (la quantité de β -actine étant similaire dans tous les tissus et cellules). Les résultats sont présentés dans la Figure 1.

Les résultats montrent que la protéine SOX9 est fortement exprimée dans tout l'épithélium du tube digestif depuis l'estomac jusqu'au rectum.

Détection de l'ARN messager de SOX9

2 µg/puits d'ARNs messagers (ARNm) isolés d'une lignée cellulaire de cancer pulmonaire humain (A549) et d'une lignée cellulaire de cancer du colon humain (SW480) ont été
5 déposés sur gel, puis détectés en utilisant la technique de transfert de Northern à l'aide d'une sonde ADNc de SOX9. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.

Les résultats montrent que la protéine SOX9 est fortement exprimée dans les cellules tumorales humaines
10 d'origine intestinale et pulmonaire.

Expression de la protéine SOX9 dans différentes lignées cellulaires de cancer du colon humain

1 µg/puits d'extrait protéique (mesuré par la méthode de Bradford) de différentes lignées cellulaires
15 provenant de cancer du colon humain (LS174, DLD-1, HCT118, SW480, HT29CI16E) a été déposé sur gel, puis analysé par transfert immunoélectrophorétique à l'aide d'un anticorps dirigé contre SOX9. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.

20 Les résultats montrent que la protéine SOX9 est exprimée dans toutes les lignées cellulaires provenant de cancer du colon humain.

EXEMPLE 2 : SUREXPRESSION DE SOX9 DANS DES CELLULES CANCEREUSES INTESTINALES.

25 La lignée cellulaire HT29CI16E est un clone isolé à partir de la lignée HT29 provenant d'un adénocarcinome intestinal humain qui possède les caractéristiques des cellules caliciformes et exprime l'antigène carcinoembryonnaire (VELCICH et al., Cell Growth Differ.
30 6(6) : 749-757, 1995). Lorsque ces cellules sont maintenues en culture à confluence, la quantité d'antigène carcinoembryonnaire augmente considérablement.

Le système T-Rex (Invitrogen) a été utilisé pour rendre les cellules HT29CI16E inductibles à la doxycycline.
35 Les cellules HT29CI16E sont transfectées de façon stable avec le plasmide pcDNA6/TR (Invitrogen) qui permet de faire exprimer la protéine répresseur Tétracycline (tetR). Les

cellules exprimant tetR sont ensuite transfectées avec le plasmide pcDNA4/TO (Invitrogen) dans lequel a été introduit la séquence nucléotidique codant pour la protéine SOX9 portant sur sa partie N-terminale un polypeptide correspondant à l'épitope FLAG, et placée sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline.

Deux clones (clones B et D) des cellules HT29CI16E, transfectées, qui expriment la protéine SOX9 après induction à la doxycycline, sont sélectionnés par transfert immunoélectrophorétique à l'aide d'anticorps anti-FLAG.

EXEMPLE 3 : INHIBITION DE L'EXPRESSION DE L'ANTIGÈNE CARCINOEMBRYONNAIRE PAR SOX9

Quantité d'ARN messager de l'antigène carcinoembryonnaire

La quantité d'ARN messager de l'antigène carcinoembryonnaire présent dans les deux clones B et D, cultivés pendant deux jours à l'état de non-confluence en absence et en présence de doxycycline, est estimée par RT-PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG (SEQ ID NO : 1)

et

TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC (SEQ ID NO : 2)

qui permettent l'amplification d'un fragment de 131 paires de bases correspondant à l'antigène carcinoembryonnaire.

Les conditions de PCR sont : 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C, 1 minute d'amplification à 72°C, 30 cycles.

Les résultats sont présentés dans la Figure 4.

+ = présence de doxycycline

- = absence de doxycycline

En présence de doxycycline, c'est à dire en conditions de surexpression de SOX9, les deux clones B et D expriment moins d'ARN messager de l'antigène carcinoembryonnaire.

Quantité de SOX9 et d'antigène carcinoembryonnaire

Le clone B des cellules HT29CI16E est cultivé pendant 5 jours à l'état de non-confluence et pendant

23 jours à confluence, en présence et en absence de doxycycline.

Par transfert immunoélectrophorétique à l'aide d'anticorps anti-FLAG et anti-antigène carcinoembryonnaire, la
5 quantité de protéine SOX9 ainsi que celle de l'antigène carcinoembryonnaire ont été évaluées.

Les résultats sont présentés dans la Figure 5.

+ = présence de doxycycline

- = absence de doxycycline

10 Après maintien des cellules en culture pendant 5 jours à l'état de non-confluence, la protéine SOX9 portant ~~l'étiquette Flag est présente dans les cellules traitées à la~~ doxycycline et absente dans les cellules non traitées. L'antigène carcinoembryonnaire est présent dans les cellules
15 non traitées à la doxycycline, c'est-à-dire dans les cellules contenant peu de SOX9, et est absent dans les cellules traitées à la doxycycline, c'est-à-dire dans les cellules contenant une quantité plus importante de SOX9.

Après maintien des cellules en culture pendant 23
20 jours à l'état de confluence, la protéine SOX9 portant l'étiquette Flag est toujours présente dans les cellules traitées à la doxycycline et absente dans les cellules non traitées. L'antigène carcinoembryonnaire est présent dans les cellules non-traitées à un taux bien plus élevé qu'après 5
25 jours de culture en absence de doxycycline. En revanche, l'antigène carcinoembryonnaire a pratiquement disparu des cellules cultivées pendant 23 jours en présence de doxycycline.

Ces résultats montrent que la sur-expression de
30 la protéine SOX9 diminue l'expression de l'antigène carcinoembryonnaire dans les cellules HT29CI16E provenant d'un adénocarcinome intestinal humain.

EXEMPLE 4 : INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE PAR SOX9

Le clone B des cellules HT29CI16E est cultivé
35 pendant 1, 2 et 3 jours, en présence et en absence de doxycycline. Dans une autre série d'expérience, le clone B

des cellules HT29CI16E est cultivé pendant 5 jours à l'état de non-confluence.

La croissance cellulaire est estimée en mesurant la quantité de protéines totales dans la boîte de culture par la méthode de Bradford.

Les résultats sont présentés dans les Figures 6 et 7.

+ = présence de doxycycline

- = absence de doxycycline

abscisse = durée de la culture (jours)

ordonnée = quantité de protéines totales par boîte de culture (mg)

Après 1 jour de culture, il y a 0,25 mg de protéines en absence de doxycycline et 0,24 mg en présence de doxycycline. Après 2 jours de culture, il y a 0,38 mg de protéines en absence de doxycycline et 0,34 mg en présence de doxycycline. Après 3 jours de culture, il y a 0,58 mg de protéines en absence de doxycycline et 0,48 mg en présence de doxycycline.

Après 5 jours à l'état de non-confluence, en absence de doxycycline, la quantité de protéines totales cellulaires est de 4 mg. Lorsqu'on induit l'expression de SOX9 à la doxycycline, la quantité de protéines totales est de 2,6 mg.

Dans une autre série d'expérience, le clone B des cellules HT29CI16E est cultivé pendant 5 jours dans une boîte de culture de six puits en présence (3 puits) ou en absence (3 puits) de doxycycline. Les cellules sont ensemencées à raison de 2×10^5 cellules/puits. Après 5 jours, les cellules sont marquées au cristal violet (marquage de l'ADN).

Les résultats sont représentés dans la Figure 8A.

En présence de doxycycline, une diminution significative du marquage de l'ADN est observée par rapport à celui du clone B cultivé en absence de doxycycline.

Afin de quantifier la quantité de cellules, après coloration au cristal violet, les cellules sont solubilisées au SDS puis la densité optique est mesurée à 570 nm. Les

résultats sont exprimés en pourcentage du clone B non induit par la doxycycline.

Les résultats sont représentés dans la Figure 8B.

+ = présence de doxycycline

5 - = absence de doxycycline

En présence de doxycycline, c'est à dire en conditions de surexpression de SOX9, une diminution d'environ 40% de la prolifération cellulaire est observée par rapport à celle du clone B cultivé en absence de doxycycline.

10 Ces résultats montrent que l'expression de la protéine SOX9 diminue la croissance cellulaire des cellules HT29CI16E ~~provenant d'un adénocarcinome intestinal humain~~ et exprimant l'antigène carcinoembryonnaire.

EXEMPLE 5 : AUGMENTATION DE L'APOPTOSE CELLULAIRE PAR SOX9

15 Le clone B des cellules HT29CI16E est cultivé pendant 4 jours, en présence et en absence de doxycycline.

L'apoptose cellulaire est mise en évidence en utilisant le DeadEnd Corimetric TUNEL System (Promega).

Les résultats sont présentés dans la Figure 9.

20 → = présence de cellules apoptotiques

Après 4 jours, en présence de doxycycline, une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques est observée par rapport au clone B cultivé en absence de doxycycline.

25 Afin de réaliser une étude statistique, le nombre de cellules totales par champs de microscope (n=4), ainsi que le nombre de cellules en apoptose par champ (n=22) ont été déterminés dans les deux conditions (absence ou présence de doxycycline). Les résultats sont présentés dans le Tableau 1
30 ci-dessous.

Tableau 1

	présence de doxycycline	absence de doxycycline
Nbr. cellules par champ (n=4)	233 +/- 17,2	328 +/- 53,3
Nbr. cellules apoptotiques par champ (n=22)	1,64 +/- 0,34	0,27 +/- 0,1

Les résultats montrent que l'inhibition de la croissance des cellules HT29CI16E provenant d'un

adénocarcinome intestinal humain et exprimant l'antigène carcinoembryonnaire lorsque l'expression de la protéine SOX9 est induite à la doxycycline, est due au moins en partie à une augmentation de l'apoptose cellulaire.

REVENDICATIONS

1) Utilisation du facteur de transcription SOX9,
ou d'une séquence d'acide nucléique codant pour ledit facteur
de transcription pour l'obtention d'un médicament destiné au
5 traitement de tumeurs exprimant l'antigène
carcinoembryonnaire, à l'exception des carcinomes mammaires
sensibles aux agonistes des récepteurs de l'acide rétinoïque.

2) Utilisation selon la revendication 1,
caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au
10 traitement du cancer du colon.

1/5

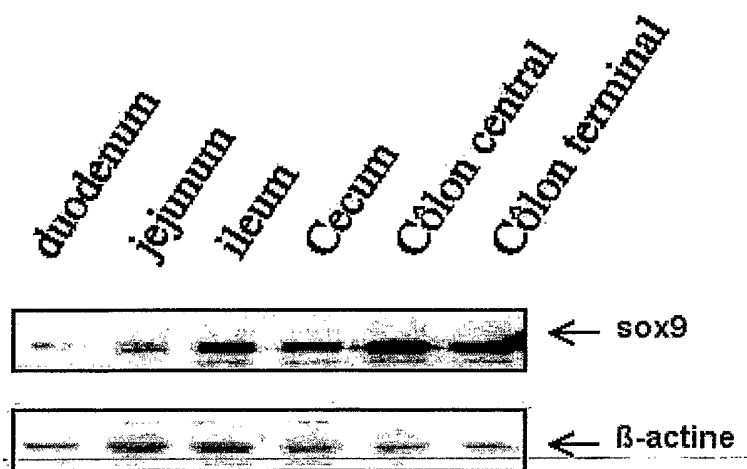


FIG. 1

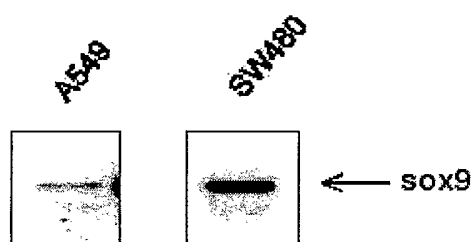


FIG. 2

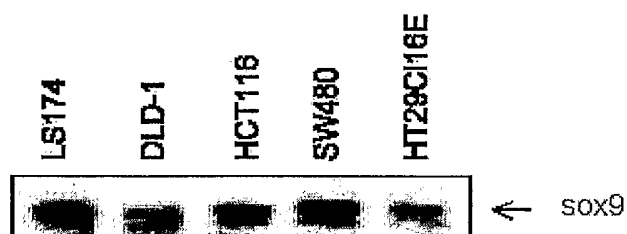


FIG. 3

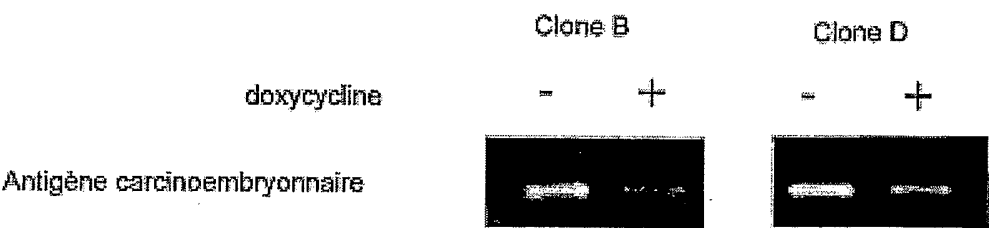


FIG. 4

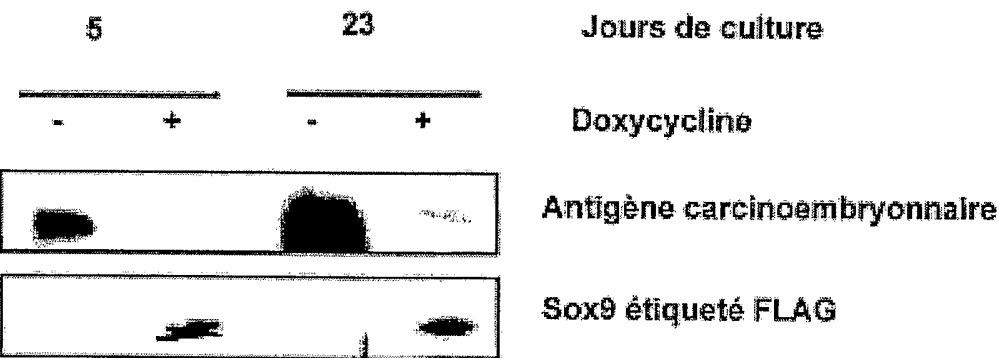


FIG. 5

3/5

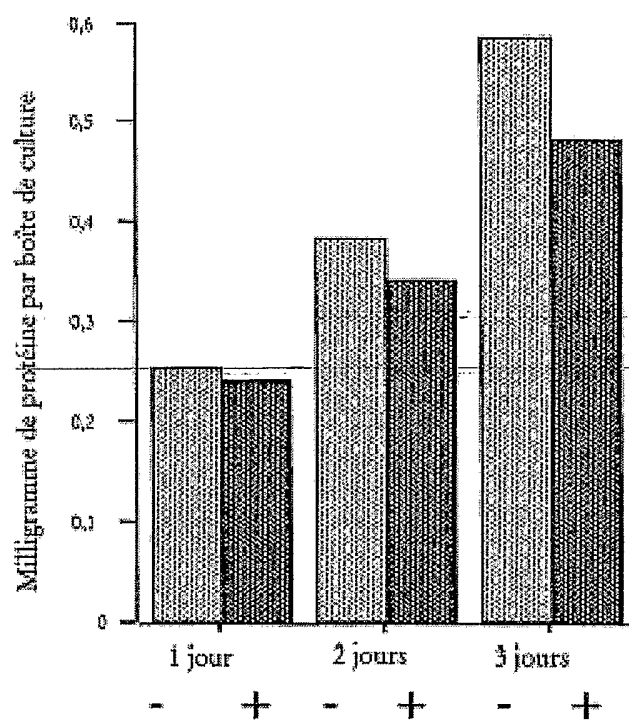


FIG. 6

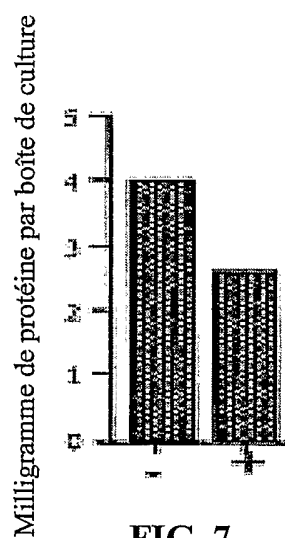
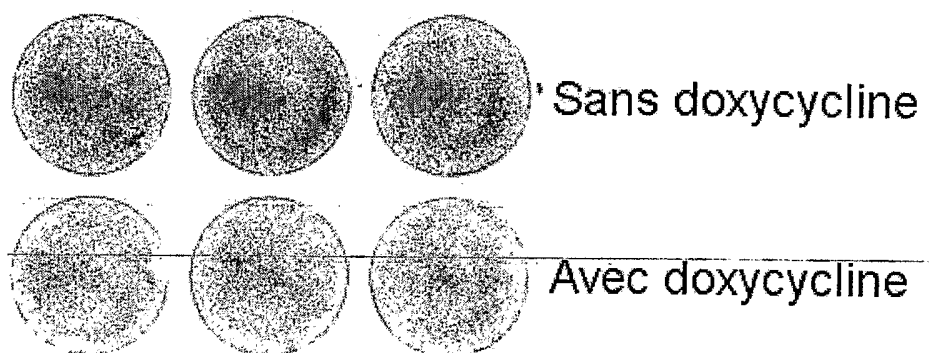


FIG. 7

4/5

A



B

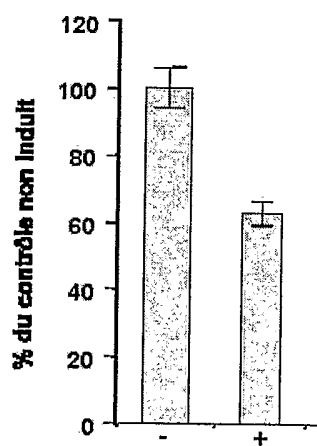


FIG. 8

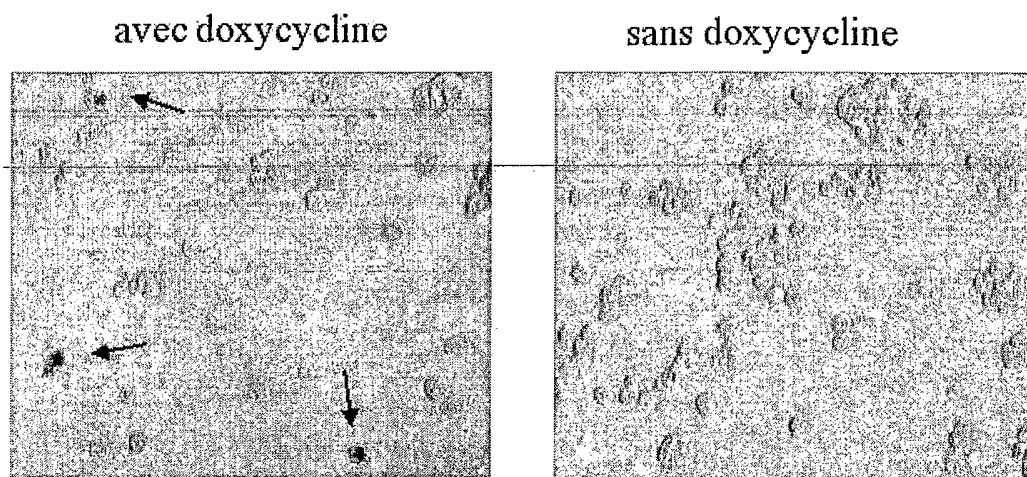


FIG. 9

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
BLACHE, Philippe
JAY, Philippe

<120> UTILISATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SOX9 POUR LE
TRAITEMENT DE TUMEURS EXPRIMANT L'ANTIGENE
CARCINOEMBRYONNAIRE.

<130> MJPbv644/111

<150> FR 03 12572

<151> 2003-10-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 1

gggccactgt cggcatcatg attgg

25

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 2

tgttagctgtt gcaaatgctt taaggaagaa gc

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/FR2004/002751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/17 A61P35/00

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 A61K 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)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAUL RONJON ET AL: "Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease." SPINE. 15 APR 2003, vol. 28, no. 8, 15 April 2003 (2003-04-15), pages 755-763, XP008031326 ISSN: 1528-1159 page 756, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 2 page 761, left-hand column, paragraph 1 page 762, left-hand column, paragraph 2 ----- -/--	1,2

☒ 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

19 April 2005

Date of mailing of the international search report

27/04/2005

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

Bayrak, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

'FR2004/002751

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AFONJA OLUBUNMI ET AL: "RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition." ONCOGENE. 7 NOV 2002, vol. 21, no. 51, 7 November 2002 (2002-11-07), pages 7850-7860, XP002283558 ISSN: 0950-9232 cited in the application page 7851, left-hand column, paragraph 2 page 7854, left-hand column, paragraph 1 page 7856, left-hand column, paragraph 1 -----	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

/FR2004/002751

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K38/17 A61P35/00

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 A61K 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)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PAUL RONJON ET AL: "Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease." SPINE. 15 APR 2003, vol. 28, no. 8, 15 avril 2003 (2003-04-15), pages 755-763, XP008031326 ISSN: 1528-1159 page 756, colonne de gauche, alinéa 1 - alinéa 2 page 761, colonne de gauche, alinéa 1 page 762, colonne de gauche, alinéa 2 ----- -/--	1,2



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



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/04/2005

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

Bayrak, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No
FR2004/002751

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	AFONJA OLUBUNMI ET AL: "RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition." ONCOGENE. 7 NOV 2002, vol. 21, no. 51, 7 novembre 2002 (2002-11-07), pages 7850-7860, XP002283558 ISSN: 0950-9232 cité dans la demande page 7851, colonne de gauche, alinéa 2 page 7854, colonne de gauche, alinéa 1 page 7856, colonne de gauche, alinéa 1 -----	1,2