



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

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C07K 14/81, A61K 38/55</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 95/33060 (43) Date de publication internationale: 7 décembre 1995 (07.12.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00670 (22) Date de dépôt international: 22 mai 1995 (22.05.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/06583 31 mai 1994 (31.05.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHARD, Jean-Marie [FR/FR]; 27, rue Charles-Gide, F-34170 Castelnau-le-Lez (FR). CARILLO, Serge [FR/FR]; 180 C, impasse du Pont, F-30000 Nîmes (FR). PEICHACZYK, Marc [FR/FR]; 123, rue des Erables, F-34980 Saint-Gely-du-Fesc (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD OF CANCER TREATMENT BY P53 PROTEIN CONTROL</p>		
<p>(54) Titre: METHODE DE TRAITEMENT DES CANCERS PAR REGULATION DE LA PROTEINE P53</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>Method of cancer treatment by controlling cellular p53 protein levels. The invention concerns, in particular, the use of a compound capable of modulating calpain activity.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>La présente invention concerne une méthode de traitement des cancers par régulation des niveaux cellulaires de la protéine p53. Elle réside plus particulièrement dans l'utilisation d'un composé capable de moduler l'activité de la calpaïne.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

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

METHODE DE TRAITEMENT DES CANCERS PAR REGULATION DE LA
PROTEINE P53

La présente invention concerne une nouvelle méthode pour le traitement des cancers. Plus particulièrement, elle concerne une méthode de traitement des cancers par régulation des niveaux cellulaires de la protéine p53. Elle concerne également des vecteurs de thérapie génique permettant de réguler la protéine p53, ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant.

Depuis une quinzaine d'années, la caractérisation moléculaire des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur a permis de jeter un regard nouveau sur le processus de la cancérogenèse. Ainsi, la connaissance de plus en plus approfondie de la régulation de ces gènes et de la fonction des protéines correspondantes permet de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques.

Plus particulièrement, l'élucidation du catabolisme des protéines oncogéniques et anti-oncogéniques représente un enjeu majeur en terme de lutte anti-cancéreuse dans la mesure où elle laisse entrevoir, dans le cas des protéines oncogéniques, la possibilité d'accélérer leur dégradation et donc d'annihiler leur action, dans le cas des suppresseurs de tumeur, d'inhiber leur dégradation et donc d'augmenter leur effet anti-prolifératif ou anti-tumoral, dans le cas de protéines mutées, de potentialiser leur présentation antigénique par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité et ainsi de stimuler une réponse immune spécifique des tumeurs, et, dans le cas où la forte expression de l'oncogène ou de l'anti-oncogène est capable d'induire la mort cellulaire programmée, la possibilité de stabiliser ces protéines pour déclencher le processus apoptotique.

Originellement, la protéine p53 a été classée comme un oncogène nucléaire puisqu'elle pouvait, dans des expériences de transfection, allonger la vie de cellules de rongeurs en culture ainsi que coopérer avec des oncogènes activés comme ras pour transformer des cellules en culture primaire. En fait, les gènes utilisés dans ces premières expériences étaient mutés et menaient à l'expression de protéines p53 variantes caractérisées par un gain de fonction. Sans exclure des fonctions qui resteraient à découvrir, on sait maintenant que la protéine p53, au moins sous sa forme sauvage, est un facteur de transcription qui régule négativement la croissance et la division cellulaire et qui, dans certaines situations, est capable d'induire l'apoptose (Yonish-Rouach et al., Nature, 352, 345-347, 1991). Ces propriétés se manifestant en situation de stress où l'intégrité de l'ADN cellulaire est menacée, p53 a été suggérée

être un "gardien du génome". La présence de p53 mutées dans environ 40 % des tumeurs humaines, tous types confondus, renforce cette hypothèse et souligne le rôle probablement crucial que jouent les mutations de ce gène dans le développement tumoral (pour revues, voir Montenarh, *Oncogene*, 7, 1673-1680, 1992 ; Oren, FASEB J., 6, 3169-3176, 1992 ; Zambetti and Levine, FASEB J., 7, 855-865, 1993).

La protéine p53 sauvage est assujettie à une régulation complexe qui fait intervenir le contrôle de sa synthèse et de son catabolisme ainsi que celui de sa localisation intracellulaire et de ses modifications post-traductionnelles (voir les revues citées plus haut). La protéine p53 sauvage est extrêmement instable avec une demi-vie de quelques minutes. Par contre, certaines protéines mutées qui s'accumulent à haut niveau dans les tumeurs ont une demi-vie significativement allongée. Peu de choses ont clairement été établies concernant la dégradation de p53. En effet, ni les sites intracellulaires de dégradation, ni le nombre et la nature des voies cataboliques empruntées, ni les motifs peptidiques marquant p53 pour sa dégradation ne sont connus. A notre connaissance, la seule information disponible concerne l'implication de l'enzyme E1 du cycle de l'ubiquitine dans certaines conditions expérimentales (Ciechanover et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 139-143, 1991 ; Chowdary et al., *Molec. Cell. Biol.* 14, 1997-2003, 1994). Par ailleurs, il a été montré que certains produits protéolytiques dérivés de p53 peuvent être présentés de manière antigénique.

La présente invention résulte en partie de la mise en évidence que les protéines p53 sont des substrats pour des protéases dépendantes du calcium : les calpaïnes. Elle résulte plus particulièrement de la démonstration que les protéines p53 sont dégradées spécifiquement par la m-calpaïne ou la μ -calpaïne. La présente invention constitue la première mise en évidence d'un mécanisme de régulation des niveaux cellulaires des protéines p53 et offre ainsi une nouvelle approche particulièrement efficace et spécifique pour moduler les niveaux de cette protéine dans des situations pathologiques telles que notamment certains cancers.

En particulier, la présente invention décrit une nouvelle approche pour le traitement des cancers, basée sur l'utilisation de composés modulateurs de l'activité des calpaïnes sur les protéines p53, qui permettent soit d'activer la dégradation de protéines p53 mutées, pour bloquer leur effet tumorigène et/ou pour augmenter la présentation de peptides immunogènes, soit de stabiliser la protéine p53 sauvage,

pour contrebalancer l'effet tumorigène des protéines mutées exprimées dans les tumeurs et/ou pour induire l'apoptose des cellules tumorales.

Un premier objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé capable de moduler l'activité de la calpaïne pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

Les calpaines sont des enzymes ubiquitaires trouvées dans la plupart des cellules mammifères (pour revue, voir Croall et deMartino, *Physiol. Rev.*, 71, 813-847, 1991). Elles sont essentiellement cytoplasmiques mais elles peuvent pénétrer dans le noyau à la faveur de la destruction de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose ou à la suite de certains stimuli. Comme indiqué ci-avant, l'activité protéolytique des calpaines est dépendante de la présence de calcium.

Les composés capables de moduler l'activité de la calpaïne au sens de la présente invention peuvent être de plusieurs types.

Il peut s'agir de composés capables d'inhiber l'activité de la calpaïne sur les protéines p53. Ces composés sont particulièrement avantageux puisqu'ils sont utilisables pour inhiber, au moins en partie, la dégradation de la protéine p53 sauvage. Ces composés permettent donc de stabiliser intracellulairement la protéine p53 sauvage et de contrebalancer l'effet des formes mutées. Parmi les composés inhibiteurs utilisables dans le cadre de l'invention on peut citer les inhibiteurs de protéases (leupeptine, aprotinine, PMSF, etc), les chélateurs du calcium (EGTA, EDTA, etc), ou des inhibiteurs plus spécifiques tels la calpastatine ou tout fragment ou dérivé de celle-ci. La calpastatine est un inhibiteur connu des calpaines. Sa séquence a été décrite dans l'art antérieur (SEQ ID n° 1). Un mode de réalisation particulièrement avantageux de la présente invention consiste à transférer dans les tumeurs un vecteur portant tout ou partie de la séquence codant pour la calpastatine. Cette approche est particulièrement adaptée au traitement des cancers présentant toujours un allèle p53 sauvage, tels que les carcinomes coliques ou bronchiques par exemple. Différents fragments ou dérivés de la calpastatine peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention. De tels fragments ou dérivés peuvent être toute molécule obtenue à partir de la séquence SEQ ID n° 1 par modification(s) de nature génétique et/ou chimique, conservant la capacité d'inhiber au moins en partie l'activité d'une calpaïne. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on entend toute mutation, délétion, substitution, addition, et/ou modification d'un ou plusieurs nucléotides. De telles modifications peuvent être effectuées dans différents buts, et notamment celui de préparer des séquences adaptées

à l'expression dans un type particulier de vecteur ou d'hôte, celui de réduire la taille de la séquence pour faciliter leur pénétration cellulaire, celui d'augmenter l'activité d'inhibition, ou, de manière particulièrement avantageuse, d'augmenter la sélectivité de l'inhibiteur vis-à-vis de l'activité des calpaïnes sur la dégradation de la protéine p53

5 sauvage.

De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels. Lorsqu'un dérivé tel que défini ci-dessus est réalisé, son activité d'inhibiteur de l'activité des calpaïnes sur les

10 protéines p53 peut être mise en évidence de plusieurs façons, et en particulier en mettant en présence ledit inhibiteur et les différentes formes de protéines p53, puis en détectant les produits de dégradation obtenus (voir exemples 1 à 3). Toute autre technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, on utilise

15 comme inhibiteur tout ou partie de la calpastatine, ou un acide nucléique codant pour tout ou partie de la calpastatine. Encore plus particulièrement, on utilise un peptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'un dérivé de celle-ci.

Concernant plus spécifiquement les dérivés, on peut citer à titre d'exemple le composé de séquence SEQ ID n° 2, qui correspond à un fragment de la calpastatine.

20 On utilise avantageusement tout dérivé composés de séquence SEQ ID n° 1 ou 2 capable d'inhiber spécifiquement ou préférentiellement la dégradation de la protéine p53 sauvage par la calpaïne.

Les composés capables de moduler l'activité de la calpaïne sur les protéines p53 au sens de la présente invention peuvent également être des dérivé de la calpaïne

25 capable de dégrader spécifiquement ou préférentiellement les protéines p53 mutées. De tels dérivés sont également très avantageux puisqu'ils permettent d'activer la dégradation des protéines p53 mutées, pour bloquer leur effet tumorigène et/ou pour augmenter la présentation de peptides immunogènes, sans affecter de manière significative les niveaux cellulaires de protéine p53 sauvage. De tels dérivés peuvent

30 être obtenus à partir de la calpaïne, par modification(s) structurales de nature génétique et/ou chimique. La capacité des dérivés ainsi obtenus de dégrader spécifiquement ou préférentiellement les protéines p453 mutées peut ensuite être mise en évidence comme décrit dans les exemples 1 à 3..

Préférentiellement, les modulateurs utilisés dans le cadre de l'invention sont des protéines ou polypeptides, ou des séquences d'acides nucléiques codant pour ces polypeptides ou protéines. Encore plus préférentiellement, les composés modulateurs sont des protéines ou polypeptides inhibiteurs spécifiques de l'activité de la calpaïne sur la protéine p53 sauvage ou des formes de calpaines, modifiées ou non, pour dégrader spécifiquement les protéines p53 mutées.

D'une manière particulièrement avantageuse, l'invention réside dans la possibilité de faire exprimer dans des cellules cancéreuses présentant à la fois un allèle p53 sauvage et un allèle p53 muté des séquences nucléiques codant pour des inhibiteurs de la calpaïne, comme la calpastatine ou partie de la calpastatine, ou des formes de calpaines, modifiées ou non, pour dégrader spécifiquement les protéines p53 mutées.

La séquence d'acides nucléiques utilisée dans le cadre de la présente invention peut être administrée telle quelle, sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Elle peut également être administrés sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), avec des lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Préférentiellement, la séquence utilisée dans le cadre de l'invention fait partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'administration de l'acide nucléique dans les cellules à traiter, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites cellules, ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable. De plus, il est possible d'introduire plusieurs séquences d'acide nucléique dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du traitement.

Le vecteur utilisé peut être d'origine diverses, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules cancéreuses humaines. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés (AAV) ou le virus de l'herpès.

A cet égard, la présente invention a également pour objet tout virus recombinant comprenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un composé capable de moduler l'activité de la calpaïne. Préférentiellement, les virus

utilisés dans le cadre de l'invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule infectée. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée.

5 Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence codant pour le modulateur des calpaïnes. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

10 S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le
15 cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de
20 l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et la séquence codant pour le modulateur des calpaïnes. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.
25 Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au
30 moyen d'agents mutagènes.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant

entre autre la séquence d'ADN codant pour le modulateur des calpaïnes. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

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

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

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus. auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant la séquence codant pour le modulateur des

calpaines bordé de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., *New Biologist* 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. *Genet. Eng.* 7 (1985) 235; McCormick, *BioTechnology* 3 (1985) 689, etc.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes dans les cellules tumorales.

Avantageusement, dans les vecteurs de l'invention, la séquence codant pour le modulateur des calpaines est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules tumorales. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du modulateur. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris du virus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules tumorales, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule tumorale.

Dans un mode particulier de réalisation, l'invention concerne un virus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour un modulateur des calpaines sous le contrôle d'un promoteur viral, choisi de préférence parmi le LTR-RSV et le promoteur CMV.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un virus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour un modulateur des calpaïnes sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules tumorales.

5 L'expression est considérée comme majoritaire au sens de l'invention lorsque, même si une expression résiduelle est observée dans d'autres types cellulaires, les niveaux d'expression sont supérieurs dans les cellules tumorales.

La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs virus recombinants défectifs tels que décrits
10 précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection
15 directe dans la tumeur du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans la tumeur du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés.

20 Les doses de virus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur viral, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants
25 selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu
30 d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature. Concernant les rétrovirus, les compositions selon l'invention peuvent comporter directement les cellules productrices, en vue de leur implantation.

La présente invention est particulièrement adaptée au traitement des cancers
35 dans lesquels des formes mutées de p53 sont observées. Plus spécifiquement, la

présente invention est particulièrement avantageuse pour le traitement des cancers dans lesquels les allèles sauvage et mutés de p53 sont présents. De tels cancers sont notamment les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, etc.

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

Légende des figures

Figure 1 : Etude de la régulation de la protéine p53 par la calpaïne. La réaction est effectuée dans un volume final de 30 μ l, dont 1 provenant du mélange de traduction. ligne 1 : T0; ligne 2 : 30 min en présence de 1mM Calcium + 20 μ g/ml Calpaïne; ligne 4 : 30 min en présence de 1mM Calcium + 20 μ g/ml Calpaïne + 0,5 mg/ml calpastatine; ligne 5 : 30 min en présence de 1mM Calcium + 20 μ g/ml Calpaïne + 10mM EGTA; ligne 6 : PBS; ligne 7 : PBS + calcium; ligne 8 : PBS + calpastatine.

Techniques générales de biologie moléculaire

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

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

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

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

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

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

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

Exemples

20 Exemple 1

Cet exemple montre que l'addition de m-calpaïne au lysat de réticulocyte de lapin induit la dégradation de la protéine p53 sauvage ainsi que celle de certaines formes mutées. Cet exemple montre également que des inhibiteurs des calpaines sont capables d'inhiber la dégradation de p53 et donc de moduler l'activité de cette protéine.

1.1. Mise en évidence de la dégradation: Les protéines p53 sauvages de souris et d'homme ainsi que diverses protéines p53 mutées (protéines humaines C273, H273, H175, I247) ont été traduites dans le lysat de réticulocyte de lapin. Les protéines ainsi obtenues sont résistantes à toute dégradation, même en présence de haute concentration de calcium (co-facteur indispensable des calpaines). L'addition de m-calpaïne de boeuf (Sigma) au lysat de réticulocyte en présence de calcium a entraîné la disparition rapide des protéines néo-synthétisées et l'apparition de fragments protéolytiques résolubles par électrophorèse. La résistance à la dégradation d'autres protéines comme la dihydrofolate réductase ou la glyceraldéhyde-3-phosphate

deshydrogénase dans les mêmes conditions expérimentales indique la spécificité de substrat de la réaction.

1.2. Utilisation d'inhibiteurs de calpaïne pour moduler les niveaux de protéines p53 : Dans l'exemple 1.1. ci-dessus, il a été montré que l'addition de m-calpaïne induisait une dégradation des protéines p53. Dans cet exemple, en plus de m-calpaïne, différents composés ont été introduits au milieu pour tester leur capacité d'inhiber l'activité de la calpaïne. Les résultats obtenus montrent que l'addition d'un chélateur du calcium (l'EGTA) ainsi que d'un peptide inhibiteur spécifique des calpaïnes (dérivé d'un inhibiteur physiologique, la calpastatine ; Maki et al., J. Biol. Chem., 254, 18866-18869, 1989) sont capables d'inhiber de la dégradation des protéines p53 induite par la calpaïne exogène.

Exemple 2

Dans l'exemple précédent, il a été montré que l'addition de calpaïne exogène à une solution de protéines p53 entraînait leur dégradation. Cet exemple montre que la dégradation de la protéine p53 sauvage ainsi que celle de certaines formes mutées peut être induite par les calpaïnes endogènes dans des extraits cytoplasmiques. Cet exemple montre également que des inhibiteurs des calpaïnes sont capables, en présence de calpaïne endogène, d'inhiber la dégradation de p53 et donc de moduler l'activité de cette protéine.

2.1. Dégradation par les calpaïnes endogènes : Les protéines p53 sauvages de souris et d'homme, ainsi que certaines formes mutées (Cf exemple 1) ont été traduites dans le lysat de réticulocyte puis ont été incubées en présence d'extraits cytoplasmiques de cellules lymphoblastoïdes humaines Daudi ou Jurkat. Les extraits cytoplasmiques ont été préparés de la manière suivante : Les cellules (accessibles à l'ATCC) ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules ont ensuite été récoltées, lavées dans un tampon PBS, puis incubées 5 min dans un tampon de lyse hypotonique sans détergent (HEPES 20 mM pH 7,5; KOAc 10 mM; MgOAc 1,5 mM; 2ml pour $5 \cdot 10^8$ cellules). La lyse a été complétée en utilisant un homogénéiseur Dounce, puis vérifiée sous microscope. Les noyaux ont ensuite été éliminés par centrifugation à 2000 g pendant 5 min, et les surnageants ont été centrifugés à 10 000g pendant 1 heure (Beckman SW60). Les extraits cytoplasmiques ont ensuite été aliquotés à raison de 5 à 12 mg/ml.

Lorsque le lysat de réticulocytes a été incubé en présence d'extraits cytoplasmiques, en l'absence de calcium, aucune dégradation n'a été observée. Par contre, en présence de calcium, une dégradation très rapide des protéines p53 a été observée, avec apparition d'un profil de produits protéolytiques caractéristique proche de celui obtenu dans l'exemple 1. Cet expérience montre bien que les protéines p53 sont

5 dégradées par les calpaïnes endogènes.

2.2. Utilisation d'inhibiteurs de calpaïne pour moduler les niveaux de protéines p53 : La chélation du calcium par l'EGTA, ainsi que l'utilisation de toute une gamme d'inhibiteurs de protéases (leupeptin, aprotinin, soybean trypsin inhibitor et PMSF) et surtout le peptide calpastatine montrent que la dégradation de ces protéines est sous

10 la dépendance des calpaïnes de l'extrait cytoplasmique, et que différents composés capables de moduler l'activité des calpaïnes peuvent être utilisés pour réguler les niveaux de protéine p53.

15 Exemple 3

Cet exemple démontre que les protéines p53 sauvages de souris et d'homme sont des substrats directs pour les calpaïnes dans les extraits cytoplasmiques.

Les exemples 1 et 2 montrent que les calpaïnes peuvent induire la dégradation de p53 dans des mélanges réactionnels complexes. Ces expériences n'excluent cependant pas que dans les conditions utilisées les calpaïnes activent des protéases secondaires qui sont celles qui agissent véritablement sur p53. Dans cet exemple, l'expérience suivante a été conduite : (1) les protéines p53 sauvages de souris et d'homme néo-synthétisées dans le lysat de réticulocyte de lapin ont été incubées

25 pendant 30 minutes en présence d'extrait cytoplasmique de cellules Daudi ainsi qu'en présence de calcium pour activer les calpaïnes comme dans l'exemple 2, (2) de la protéine p53 a alors été rajoutée au mélange réactionnel et la réaction a été poursuivie 30 minutes dans des conditions permissives (mêmes conditions réactionnelles) ou non (addition soit d'EGTA pour chélater le calcium, soit de peptide calpastatine) pour les

30 calpaïnes. En présence de calcium, la protéine p53 nouvellement ajoutée est complètement dégradée indiquant que l'activité protéase est fonctionnelle tout le temps de l'expérience. Quand les calpaïnes sont inhibées par la présence d'EGTA ou, plus significativement, du peptide calpastatin, la protéine p53 nouvellement ajoutée n'est par contre plus dégradée. Cette dernière observation exclut donc la possibilité

que dans la première partie de l'expérience les calpaines aient induit une seconde protéase responsable de la dégradation de p53 (figure 1).

Exemple 4

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comportant
5 une séquence d'acides nucléiques codant pour la calpastatine. Cet adénovirus est construit par recombinaison homologue entre l'adénovirus déficient Ad-dl1324 et un plasmide portant la séquence SEQ ID n° 1 sous contrôle du promoteur RSV.

4.1. Construction du plasmide SEQ ID n° 1

Le plasmide SEQ ID n° 1 comporte la séquence codant pour la calpastatine
10 sous le contrôle du promoteur LTR-RSV, ainsi que des régions de l'adénovirus permettant la recombinaison homologue. Il est construit par insertion de la séquence SEQ ID n° 1 dans le plasmide pAd.RSV β gal. Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'→3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5
15 comprenant : la séquence ITR, l'origine de répllication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;

- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),

- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la
20 recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le plasmide pAd.RSV β Gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

4.2. Construction de l'adénovirus recombinant

Le vecteur décrit en 4.1. est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur
25 adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E11B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus recombinant est obtenu par recombinaison
homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell
30 31 (1982) 543) et le vecteur décrit dans l'exemple 4.1., selon le protocole suivant : le plasmide SEQ ID n° 1 et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés

sont ensuite sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

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

LISTE DE SEQUENCES

- 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:
- (i) DEPOSANT:
- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 10 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: Methode de traitement des cancers par
 15 regulation de la protéine p53.
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2
- (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 20 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 2085 paires de bases
 30 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
- 40 (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT:1..2085
 45 (D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "Calpastatine humaine"
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- 50 ATG GAA GGA CCA CAT CTT CCT AAC AAG AAA AAA CAC AAA AAA CAG GCT 48
 Met Glu Gly Pro His Leu Pro Asn Lys Lys Lys His Lys Lys Gln Ala
 1 5 10 15
- 55 GTA AAA ACA GAA CCT GAG AAG AAG TCA CAG TCA ACC AAG CTG TCT GTG 96
 Val Lys Thr Glu Pro Glu Lys Lys Ser Gln Ser Thr Lys Leu Ser Val
 20 25 30
- 60 GTT CAT GAG AAA AAA TCC CAA GAA GGA AAG CCA AAA GAA CAC ACA GAG 144
 Val His Glu Lys Lys Ser Gln Glu Gly Lys Pro Lys GAA CAC ACA GAG
 35 40 45
- CCA AAA AGC CTA CCC AAG CAG GCA TCA GAT ACA GGA AGT AAC GAT GCT 192
 Pro Lys Ser Leu Pro Lys Gln Ala Ser Asp Thr Gly Ser Asn Asp Ala

	Lys	Ala	Lys	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp	Glu	Thr	
	305					310					315					320	
5	ATC	CCA	TCT	GAG	TAC	AGA	TTA	AAA	CCA	GCC	ACG	GAT	AAA	GAT	GGA	AAA	1008
	Ile	Pro	Ser	Glu	Tyr	Arg	Leu	Lys	Pro	Ala	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	
				325					330					335			
10	CCA	CTA	TTG	CCA	GAG	CCT	GAA	GAA	AAA	CCC	AAG	CCT	CGG	AGT	GAA	TCA	1056
	Pro	Leu	Leu	Pro	Glu	Pro	Glu	Glu	Lys	Pro	Lys	Pro	Arg	Ser	Glu	Ser	
				340					345					350			
15	GAA	CTC	ATT	GAT	GAA	CTT	TCA	GAA	GAT	TTT	GAC	CGG	TCT	GAA	TGT	AAA	1104
	Glu	Leu	Ile	Asp	Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Ser	Glu	Cys	Lys	
			355					360					365				
20	GAG	AAA	CCA	TCT	AAG	CCA	ACT	GAA	AAG	ACA	GAA	GAA	TCT	AAG	GCC	GCT	1152
	Glu	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Glu	Lys	Thr	Glu	Glu	Ser	Lys	Ala	Ala	
			370				375						380				
25	GCT	CCA	GCT	CCT	GTG	TCG	GAG	GCT	GTG	TCT	CGG	ACC	TCC	ATG	TGT	AGT	1200
	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Cys	Ser	
	385					390					395					400	
30	ATA	CAG	TCA	GCA	CCC	CCT	GAG	CCG	GCT	ACC	TTG	AAG	GGC	ACA	GTG	CCA	1248
	Ile	Gln	Ser	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Ala	Thr	Leu	Lys	Gly	Thr	Val	Pro	
				405					410						415		
35	GAT	GAT	GCT	GTA	GAA	GCC	TTG	GCT	GAT	AGC	CTG	GGG	AAA	AAG	GAA	GCA	1296
	Asp	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Lys	Lys	Glu	Ala	
			420					425						430			
40	GAT	CCA	GAA	GAT	GGA	AAA	CCT	GTG	ATG	GAT	AAA	GTC	AAG	GAG	AAG	GCC	1344
	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Asp	Lys	Val	Lys	Glu	Lys	Ala	
			435				440					445					
45	AAA	GAA	GAA	GAC	CGT	GAA	AAG	CTT	GGT	GAA	AAA	GAA	GAA	ACA	ATT	CCT	1392
	Lys	Glu	Glu	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Ile	Pro	
		450				455						460					
50	CCT	GAT	TAT	AGA	TTA	GAA	GAG	GTC	AAG	GAT	AAA	GAT	GGA	AAG	CCA	CTC	1440
	Pro	Asp	Tyr	Arg	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	
	465				470					475						480	
55	CTG	CCA	AAA	GAG	TCT	AAG	GAA	CAG	CTT	CCA	CCC	ATG	AGT	GAA	GAC	TTC	1488
	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Lys	Glu	Gln	Leu	Pro	Pro	Met	Ser	Glu	Asp	Phe	
				485					490						495		
60	CTT	CTG	GAT	GCT	TTG	TCT	GAG	GAC	TTC	TCT	GGT	CCA	CAA	AAT	GCT	TCA	1536
	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp	Phe	Ser	Gly	Pro	Gln	Asn	Ala	Ser	
			500						505					510			
65	TCT	CTT	AAA	TTT	GAA	GAT	GCT	AAA	CTT	GCT	GCT	GCC	ATC	TCT	GAA	GTG	1584
	Ser	Leu	Lys	Phe	Glu	Asp	Ala	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Ile	Ser	Glu	Val	
			515				520					525					
70	GTT	TCC	CAA	ACC	CCA	GCT	TCA	ACG	ACC	CAA	GCT	GGA	GCC	CCA	CCC	CGT	1632
	Val	Ser	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	
			530			535						540					
75	GAT	ACC	TCG	CAG	AGT	GAC	AAA	GAC	CTC	GAT	GAT	GCC	TTG	GAT	AAA	CTC	1680
	Asp	Thr	Ser	Gln	Ser	Asp	Lys	Asp	Leu	Asp	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Leu	
	545				550						555					560	

	TCT	GAC	AGT	CTA	GGA	CAA	AGG	CAG	CCT	GAC	CCA	GAT	GAG	AAC	AAA	CCA	1728
	Ser	Asp	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Gln	Pro	Asp	Pro	Asp	Glu	Asn	Lys	Pro	
					565					570					575		
5	ATG	GGA	GAT	AAA	GTA	AAG	GAA	AAA	GCT	AAA	GCT	GAA	CAT	AGA	GAC	AAG	1776
	Met	Gly	Asp	Lys	Val	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Ala	Glu	His	Arg	Asp	Lys	
				580					585					590			
10	CTT	GGA	GAA	AGA	GAT	GAC	ACT	ATC	CCA	CCT	GAA	TAC	AGA	CAT	CTC	CTG	1824
	Leu	Gly	Glu	Arg	Asp	Asp	Thr	Ile	Pro	Pro	Glu	Tyr	Arg	His	Leu	Leu	
			595					600					605				
15	GAT	GAT	AAT	GGA	CAG	GAC	AAA	CCA	GTG	AAG	CCA	CCT	ACA	AAG	AAA	TCA	1872
	Asp	Asp	Asn	Gly	Gln	Asp	Lys	Pro	Val	Lys	Pro	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	
		610					615					620					
20	GAG	GAT	TCA	AAG	AAA	CCT	GCA	GAT	GAC	CAA	GAC	CCC	ATT	GAT	GCT	CTC	1920
	Glu	Asp	Ser	Lys	Lys	Pro	Ala	Asp	Asp	Gln	Asp	Pro	Ile	Asp	Ala	Leu	
		625				630					635					640	
25	TCA	GGA	GAT	CTG	GAC	AGC	TGT	CCC	TCC	ACT	ACA	GAA	ACC	TCA	CAG	AAC	1968
	Ser	Gly	Asp	Leu	Asp	Ser	Cys	Pro	Ser	Thr	Thr	Glu	Thr	Ser	Gln	Asn	
				645						650					655		
30	ACA	GCA	AAG	GAT	AAG	TGC	AAG	AAG	GCT	GCT	TCC	AGC	TCC	AAA	GCA	CCT	2016
	Thr	Ala	Lys	Asp	Lys	Cys	Lys	Lys	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	
			660						665					670			
35	AAG	AAT	GGA	GGT	AAA	GCG	AAG	GAT	TCA	GCA	AAG	ACA	ACA	GAG	GAA	ACT	2064
	Lys	Asn	Gly	Gly	Lys	Ala	Lys	Asp	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	
			675					680						685			
40	TCC	AAG	CCA	AAA	GAT	GAC	TAA										2085
	Ser	Lys	Pro	Lys	Asp	Asp	*										
		690					695										

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

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 399 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

50 (iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: homo sapiens

55 (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMMENT:1..399

60 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

	TCA	GGC	ATG	GAT	GCT	GCT	TTG	GAT	GAC	TTA	ATA	GAT	ACT	TTA	GGA	GGA	48
	Ser	Gly	Met	Asp	Ala	Ala	Leu	Asp	Asp	Leu	Ile	Asp	Thr	Leu	Gly	Gly	

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un composé capable de moduler l'activité de la calpaïne pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le composé est une protéine ou un polypeptide inhibiteur de l'activité de la calpaïne, ou une séquence d'acides nucléiques codant pour un tel polypeptide ou protéine.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que le composé est une protéine ou un polypeptide inhibiteur spécifique de l'activité de la calpaïne sur la protéine p53 sauvage, ou une séquence d'acides nucléiques codant pour un tel polypeptide ou protéine.
4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur.
- 15 5. Utilisation selon la revendication 4 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur viral, choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.
6. Utilisation selon la revendication 4 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur liposomal, lipidique
7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique codant pour tout ou partie de la calpastatine.
- 20 8. Utilisation selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'un dérivé de celle-ci.
9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique est choisi parmi les séquences SEQ ID n° 1 et 2.
- 25 10. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique est choisi parmi les dérivés des séquences SEQ ID n° 1 ou 2 codant pour des inhibiteurs spécifiques de la dégradation de la protéine p53 sauvage.

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que le composé est un dérivé de la calpaïne capable de dégrader spécifiquement les protéines p53 mutées.

5 12. Vecteur viral comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide inhibiteur de l'activité de la calpaïne.

13. Vecteur selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.

14. Vecteur selon l'une des revendications 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour tout ou partie de la calpastatine.

10 15. Vecteur selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour un dérivé de la calpaïne capable de dégrader spécifiquement les protéines p53 mutées.

15 16. Composition pharmaceutique comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour tout ou partie de la calpastatine ou pour un dérivé de la calpaïne capable de dégrader spécifiquement les protéines p53 mutées.

17. Composition selon la revendication 16 formulée en vue d'une administration intra-tumorale.

HUMAINE

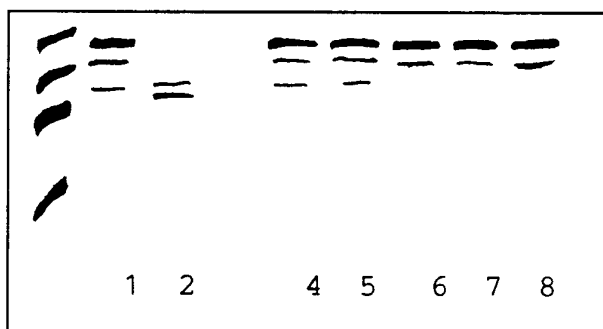
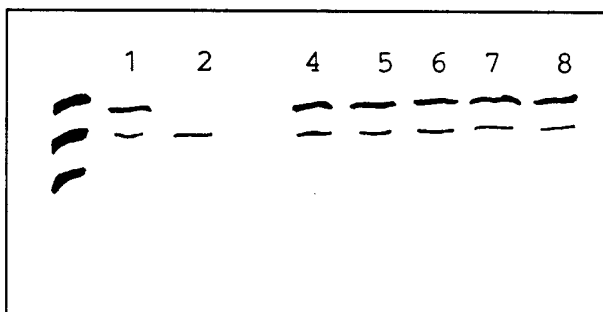


FIG 1 a



SOURIS

Figure 1 b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/81 A61K38/55

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N 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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 395 309 (TAKARA SHUZO CO. LTD) 31 October 1990 see page 2, column 1, line 20 - line 47 ---	1,2,7-9
X	WO,A,93 02106 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 4 February 1993 see the whole document see page 27, line 33 - page 28, line 4 see page 32, line 19 - line 22 ---	1,2,7
X	EP,A,0 569 122 (THE KITASATO INSTITUTE) 10 November 1993 see page 2, line 1 - line 9 see page 7, line 49 - line 52 ---	1,2
X	EP,A,0 580 161 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 26 January 1994 see the whole document ---	1
	-/--	

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

3

Date of the actual completion of the international search 24 August 1995	Date of mailing of the international search report 29. 08. 95
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 Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00670

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 159 678 (CANCER INSTITUTE OF JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH) 30 October 1985 see the whole document ---	1
X	US,A,4 788 219 (YOSHIO SAKURAI & TAKASHI TSURUO) 29 November 1988 see the whole document ---	1
P,A	ONCOGENE, vol.9, no.6, June 1994 pages 1679 - 1689 CARILLO, S. ET AL. 'Differential sensitivity of FOS and JUN family members to calpains' see the whole document ---	1
P,X	WO,A,94 21817 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 29 September 1994 see the whole document -----	1,2,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0395309	31-10-90	JP-A- 2307000	20-12-90
		US-A- 5189144	23-02-93
WO-A-9302106	04-02-93	US-A- 5340922	23-08-94
		CA-A- 2113202	04-02-93
		EP-A- 0596031	11-05-94
		JP-T- 7503452	13-04-95
EP-A-0569122	10-11-93	JP-A- 6041067	15-02-94
		AU-B- 3405893	04-11-93
		CA-A- 2091400	21-10-93
		US-A- 5336783	09-08-94
EP-A-0580161	26-01-94	CA-A- 2101117	23-01-94
		EP-A- 0582143	09-02-94
		CA-A- 2101417	15-02-94
		JP-A- 6172211	21-06-94
EP-A-0159678	30-10-85	JP-B- 7053665	07-06-95
		JP-A- 60222420	07-11-85
		US-A- 4788219	29-11-88
US-A-4788219	29-11-88	JP-B- 7053665	07-06-95
		JP-A- 60222420	07-11-85
		EP-A- 0159678	30-10-85
WO-A-9421817	29-09-94	AU-B- 6367494	11-10-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr internationale No
PCT/FR 95/00670

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/81 A61K38/55</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>		
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K C07K</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 395 309 (TAKARA SHUZO CO. LTD) 31 Octobre 1990 voir page 2, colonne 1, ligne 20 - ligne 47 ---	1,2,7-9
X	WO,A,93 02106 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 4 Février 1993 voir le document en entier voir page 27, ligne 33 - page 28, ligne 4 voir page 32, ligne 19 - ligne 22 ---	1,2,7
X	EP,A,0 569 122 (THE KITASATO INSTITUTE) 10 Novembre 1993 voir page 2, ligne 1 - ligne 9 voir page 7, ligne 49 - ligne 52 --- -/--	1,2
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p>24 Août 1995</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p>29.08.95</p>
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>Chambonnet, F</p>

3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr 'internationale No
PCT/FR 95/00670

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	EP,A,0 580 161 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 26 Janvier 1994 voir le document en entier ---	1
X	EP,A,0 159 678 (CANCER INSTITUTE OF JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH) 30 Octobre 1985 voir le document en entier ---	1
X	US,A,4 788 219 (YOSHIO SAKURAI & TAKASHI TSURUO) 29 Novembre 1988 voir le document en entier ---	1
P,A	ONCOGENE, vol.9, no.6, Juin 1994 pages 1679 - 1689 CARILLO, S. ET AL. 'Differential sensitivity of FOS and JUN family members to calpains' voir le document en entier ---	1
P,X	WO,A,94 21817 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 29 Septembre 1994 voir le document en entier -----	1,2,7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No
PCT/FR 95/00670

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0395309	31-10-90	JP-A- 2307000	20-12-90
		US-A- 5189144	23-02-93
WO-A-9302106	04-02-93	US-A- 5340922	23-08-94
		CA-A- 2113202	04-02-93
		EP-A- 0596031	11-05-94
		JP-T- 7503452	13-04-95
EP-A-0569122	10-11-93	JP-A- 6041067	15-02-94
		AU-B- 3405893	04-11-93
		CA-A- 2091400	21-10-93
		US-A- 5336783	09-08-94
EP-A-0580161	26-01-94	CA-A- 2101117	23-01-94
		EP-A- 0582143	09-02-94
		CA-A- 2101417	15-02-94
		JP-A- 6172211	21-06-94
EP-A-0159678	30-10-85	JP-B- 7053665	07-06-95
		JP-A- 60222420	07-11-85
		US-A- 4788219	29-11-88
US-A-4788219	29-11-88	JP-B- 7053665	07-06-95
		JP-A- 60222420	07-11-85
		EP-A- 0159678	30-10-85
WO-A-9421817	29-09-94	AU-B- 6367494	11-10-94