

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication :

3 048 698

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

16 52040

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 K 14/435** (2016.01), A 61 K 38/17, A 61 P 35/
00, C 07 K 19/00

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 INHIBITEURS DE L'INTERACTION BCL2 L10 / RECEPTEUR IP3.

②2 Date de dépôt : 11.03.16.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 15.09.17 Bulletin 17/37.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 05.03.21 Bulletin 21/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : UNIVERSITE CLAUDE BERNARD
LYON 1 Etablissement public —FR, CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Etablissement public FR, INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE FR et
CENTRE LEON BERARD Etablissement public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : NOUGAREDE ADRIEN, RIMOKH
RUTH, GILLET GERMAIN et POPGEORGIEV
NIKOLAY.

⑦3 Titulaire(s) : UNIVERSITE CLAUDE BERNARD
LYON 1 Etablissement public, CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement
public, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE, CENTRE LEON BERARD
Etablissement public.

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

FR 3 048 698 - B1



DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine pharmaceutique, et plus particulièrement au domaine de l'oncologie, notamment au domaine du traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

5 **ART ANTERIEUR**

Le cancer est une maladie de l'homme et des animaux qui est la plupart du temps mortelle, et qui se traduit par une croissance incontrôlée des cellules endogènes. Le terme « cancer » est utilisé pour désigner la formation de tumeurs malignes et de néoplasmes (tumeurs ou carcinomes). Généralement, la croissance des cancers comporte deux étapes, à savoir la croissance tumorale locale puis la dissémination cancéreuse. La croissance tumorale locale consiste en l'apparition d'un clone tumoral, à partir d'une cellule « transformée », sous l'action d'agents carcinogènes initiateurs et promoteurs. La prolifération cellulaire aboutit à la constitution de la tumeur. La dissémination cancéreuse à partir de la tumeur initiale peut s'effectuer par dissémination régionale et/ou par développement de tumeurs secondaires appelées métastases.

Pour traiter le cancer, différentes techniques telles que la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la thérapie anti-angiogénique, ont été développées.

Le choix de la ou des thérapie(s) les plus adaptées est basée sur différents facteurs, et dépend notamment du protocole thérapeutique habituellement suivi pour chaque type de cancer, du stade de la maladie lors du diagnostic, et de l'état général du patient.

Il s'avère cependant que l'utilisation de certains produits de chimiothérapie, destinés à tuer les cellules cancéreuses en induisant leur apoptose, peut s'avérer être efficace sur certains patients mais inefficace sur d'autres.

25 Certains biomarqueurs ont été identifiés, dont la présence ou la surexpression a été observée chez des patients présentant des résistances à des médicaments pourtant connus pour leur efficacité dans la pathologie considérée.

Ainsi, les praticiens s'attachent d'une part à déterminer les patients susceptibles de répondre à certains traitements, et ceux susceptibles d'être résistants à ces traitements, et d'autre part à mettre au point des stratégies permettant d'obtenir une efficacité renforcée des produits anti-cancéreux chez les patients présentant une réponse insuffisante aux traitements

classiques. La présente invention a pour objet de satisfaire à ce besoin de potentialisation des traitements existants, notamment chez les patients présentant une résistance à ces traitements.

Molécules de la famille Bcl-2

Les traitements dits de chimiothérapie sont basés sur l'administration de molécules
5 chimiques destinées à induire l'apoptose des cellules cancéreuses présentes chez un patient.

L'apoptose, aussi appelée « Mort Cellulaire Programmée », joue un rôle clef dans de nombreux processus biologiques, normaux et pathologiques. On distingue deux voies majoritaires de l'apoptose, la voie intrinsèque au niveau de la mitochondrie, et la voie extrinsèque activée par des signaux extracellulaires spécifiques.

10 Les protéines de la famille Bcl-2 sont les régulateurs principaux de l'apoptose mitochondriale. L'appartenance d'une protéine à la famille Bcl-2 est liée à la présence d'un ou plusieurs domaines d'homologie de séquence peptidique avec la protéine initialement identifiée, nommé domaine BH (Bcl-2 Homology domains).

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent réguler l'apoptose en favorisant (pro-
15 apoptotiques) ou en inhibant (anti-apoptotiques) la mort cellulaire programmée. Cette famille de protéines est divisée en 3 sous-groupes :

- les protéines pro-apoptotiques effectrices telles que Bax et Bak, qui une fois activées par des signaux cellulaires, vont s'insérer dans la membrane mitochondriale externe pour provoquer le relargage de cytochrome C, induisant alors l'apoptose.
- 20 - les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2A1, Bcl-W, et Bcl-B/Bcl-2 L10, qui vont inhiber l'apoptose en interagissant directement avec les protéines pro-apoptotiques pour les neutraliser. La poche d'interaction hydrophobe formée par les domaines BH3, BH1 et BH2 des protéines anti-apoptotiques permet la fixation du domaine BH3 des protéines Bax et Bak, conduisant ainsi leur
25 neutralisation. Ces protéines possèdent, de plus, un quatrième domaine BH4 impliqué dans la régulation des flux calciques.
- les protéines « BH3-only », qui ne contiennent qu'un seul domaine d'homologie BH3. Ces protéines BH3-only se fixent dans la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, les empêchant de neutraliser Bax et Bak. Certaines thérapies utilisent une
30 structure chimique similaire au BH3 des BH3-only pour inhiber les protéines Bcl-2 anti-apoptotique et induire la mort cellulaire. Ces molécules sont appelées BH3 mimétiques (Besbes *et al.*, 2015).

Les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose, notamment en favorisant ou en inhibant la perméabilité de la membrane externe mitochondriale au cytochrome C. Le relargage du cytochrome C dans le cytosol conduit alors à l'activation des Caspases (Cystéines-Aspartate Protéases), protéases qui sont responsables du clivage enzymatique de nombreuses protéines cellulaires induisant ainsi la mort de la cellule.

D'autres stimuli peuvent également déclencher le relargage du cytochrome C, comme un influx calcique massif depuis le réticulum endoplasmique vers le cytosol puis la mitochondrie.

Au cours de la tumorigenèse, il est fréquemment observé une surexpression des protéines anti-apoptotiques, qui permet aux cellules tumorales d'échapper aux contrôles endogènes de l'organisme, ainsi qu'aux médicaments destinés à induire leur mort cellulaire.

L'importance des processus biologiques contrôlés par la famille Bcl-2 en fait une famille de protéines très étudiée. Cependant, dans le groupe des anti-apoptotiques, la fonction de certains d'entre eux reste mal connue ; c'est notamment le cas du produit du gène *bcl2-l10/bcl-b/nrh*.

Bcl-2 L10

Le gène *bcl-2 l10* est évolutivement conservé, en particulier chez les vertébrés (Arnaud et al, 2006).

Chez l'Homme, l'expression de *bcl-2 l10* dans les tissus normaux adultes serait restreinte aux ovocytes, aux ovaires et aux cellules lymphocytaires B. Chez la souris, son invalidation n'a pas donné de phénotype observable.

Chez le poisson zèbre, on détecte son expression à des stades précoces du développement. Dans ce modèle animal, où le gène *bcl-2 l10* est appelé *nrz*, ce gène est indispensable au développement embryonnaire, son invalidation provoquant un phénotype létal. Il a été montré que la protéine Nrz est capable de réguler le trafic de calcium dans la cellule en interagissant, au niveau du réticulum endoplasmique, avec IP3R1, canal calcique sensible à l'Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (Popgeorgiev et al., 2011).

La protéine Bcl-2 L10/Nrz est capable d'interagir avec le domaine de fixation du ligand IP3 du récepteur IP3R1 (IP3BD) via son domaine BH4. La protéine recombinante Nrz s'est avérée capable d'inhiber la fixation d'IP3 sur le récepteur IP3R1. Le domaine BH4 est

requis pour l'interaction avec le récepteur IP3R1, mais n'est pas suffisant à lui seul pour inhiber le relargage de Ca^{2+} via IP3R1 (Bonneau *et al.*, 2014).

Dans un contexte pathologique, chez l'Homme, l'expression du gène *bcl-2 110* est corrélée à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein, de la prostate, du poumon, les leucémies aiguës myéloblastiques, et les syndromes myélodysplasiques (Krajewska *et al.*, 2008 ; Cluzeau *et al.*, 2012). Le gène *bcl-2 110* est ainsi considéré comme un marqueur de mauvais pronostic pour ces pathologies tumorales. La détection de la protéine produit de ce gène comme test diagnostique de résistance à l'azacytidine dans les tumeurs hématopoïétiques a fait l'objet d'une demande de brevet (WO2013/128089 A1).

10 **Récepteurs IP3R**

Différentes protéines de la famille de Bcl-2 sont capables d'empêcher le processus de mort cellulaire programmée, notamment en régulant négativement les flux calciques.

Le calcium (Ca^{2+}) est un messager intracellulaire universel qui régule des activités cellulaires très diverses telles que la différenciation ou la mort cellulaire à travers un réseau de signalisation hautement élaboré, à partir de sources extracellulaires et intracellulaires de Ca^{2+} .

Les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate, ci-après dénommés 'IP3R', sont des canaux calciques tétramériques situés sur la membrane du réticulum endoplasmique, présents dans toutes les cellules. Ces canaux contrôlent la libération de calcium à partir de ce compartiment en direction du cytosol, en réponse à de nombreux signaux induits notamment par des récepteurs tyrosine kinase et des récepteurs de la membrane plasmique couplés aux protéines G, responsables de variations de concentration d'IP3, le ligand activateur des IP3R. De fortes concentrations d'IP3 entraînent une libération importante d'ions calcium dans le cytosol.

Trois types de récepteur IP3R ont été identifiés et sont désignées IP3R1, IP3R2 et IP3R3. Ces récepteurs de grande taille, comprenant plus de 2500 acides aminés, sont divisés en plusieurs domaines (voir figure 1).

La protéine Bcl-2 interagit via son domaine BH4 avec le récepteur IP3R1 au niveau du domaine MTD II (Rong *et al.*, 2008) et dans la partie C-terminale (Monaco *et al.*, 2012). La seule présence du domaine BH4 est suffisante pour bloquer le relargage du calcium par les récepteurs IP3R (Rong *et al.*, 2009). Ceci a été démontré notamment par l'utilisation d'un peptide de 20 acides aminés, mimant le domaine de liaison de la portion centrale d'IP3R1

(acides aminés 1389-1408), qui interagit avec le domaine BH4 de Bcl-2 et ainsi bloque ses activités biologiques.

En utilisant ce peptide, il a été montré qu'il est possible d'inhiber la fonction de la protéine Bcl-2 dans la régulation des flux calciques, et ainsi de favoriser et/ou d'induire l'apoptose de différents types de cellules tumorales (Zhong *et al.*, 2011 ; Lavik *et al.*, 2015). L'utilisation de ce peptide comme médicament, notamment pour traiter des cancers caractérisés par une expression cellulaire de Bcl-2, a été proposée (WO2012/031103).

Cette stratégie présente l'inconvénient d'être peu spécifique, car de nombreuses protéines de la famille Bcl-2 sont susceptibles d'interagir avec ce peptide mimant le domaine central d'IP3R1, et donc d'être neutralisées. En particulier, il a été montré que ce site de liaison est également utilisé par la protéine Bcl-X_L (Monaco *et al.*, 2012(1)). Or, l'action de cette protéine fait intervenir des mécanismes biologiques différents de ceux médiés par Bcl-2 (Monaco *et al.*, 2012(2)).

Par ailleurs, l'utilisation d'un tel peptide dérivé de IP3R1, potentiellement capable de neutraliser d'autres voies de signalisation de façon non spécifique, pourrait induire des effets secondaires importants.

Malgré son implication dans la tumorigenèse, et son rôle comme outil de diagnostic, la fonction de la protéine codée par *bcl2-l10* reste mal connue et à ce jour, aucune solution n'a été trouvée pour cibler et inhiber spécifiquement l'activité de cette protéine qui promeut la survie des cellules tumorales, y compris lorsque les patients sont soumis à des traitements à base de composés de chimiothérapie.

Des composés permettant de bloquer la fonction biologique de la protéine Bcl-2 L10 lorsque celle-ci se lie au récepteur IP3R, et ainsi bloque l'influx de calcium dans le cytosol qui devrait être déclenché par un traitement de chimiothérapie, sont activement recherchés afin de potentialiser les effets des traitements de chimiothérapie.

Ces composés doivent avantageusement présenter plusieurs caractéristiques : empêcher la liaison de Bcl-2 L10 au récepteur IP3R, mais sans inhiber la liaison du ligand IP3 sur son récepteur ; ne pas inhiber les autres fonctions biologiques de Bcl-2 L10 ; et ne pas inhiber les autres protéines de la famille Bcl-2.

La présente demande présente des composés qui répondent à ce besoin.

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention concerne un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand IP3 d'au moins l'un des récepteurs IP3R.

La présente invention concerne tout particulièrement un inhibiteur qui comprend un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 1 [RERTELLADY], les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.

La présente invention concerne également un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au domaine de liaison au ligand IP3 d'au moins l'un des récepteurs IP3R, pour son utilisation en tant que médicament.

La présente invention concerne en particulier cet inhibiteur pour son utilisation dans le traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

Selon un aspect particulier de l'invention, cet inhibiteur est utilisé en combinaison avec au moins un produit de chimiothérapie, dans le traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant, dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, au moins un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au domaine de liaison au ligand IP3 d'au moins l'un des récepteurs IP3R.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la structure primaire du récepteur à l'IP3 de type 1 humain (hIP3R1), découpé en sept domaines fonctionnels : SD (Suppressor Domain), IP3BD (IP3 ligand Binding Domain), MTD (Modulatory and Transducing Domain), CFD (Channel Forming Domain) et CD (Coupling Domain). Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL interagissent avec les domaines MTD II et Coupling Domain. La protéine Nrh interagit avec le domaine de liaison à l'IP3 (IP3BD). Des peptides se fixant à ce récepteur ont préalablement été décrits, mais ont des sites de fixation différents, comme indiqué.

Figure 2 : Immunoblot de la protéine Nrh endogène à partir des fractions totales, mitochondriales (Mito), réticulaires (RE) ou solubles après centrifugation à 100000G (S100) obtenues à partir de cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231. Les protéines vinculin, calnexin et FOF1 sont utilisées en témoin.

Figure 3 : Cinétique d'apoptose (Activité des Caspases 3 et 7) en réponse à 10 μ M de Thapsigargine (THG) sur 36h de cellules MDA-MB-231 transfectées par des siRNA contre Nrh (si3-Nrh et si6-Nrh), ou avec un siRNA contrôle (siSCR). L'incubation avec le DMSO sert de témoin négatif vis-à-vis de l'incubation avec la Thapsigargine.

5 **Figure 4 :**

(A) Schéma des constructions réalisées à partir du gène *nrh* et ciblées à la mitochondrie (Nrh-ActA, avec domaine d'adressage mitochondriale ActA de *L. monocytogene*), au réticulum endoplasmique (Nrh-cb5, avec domaine d'adressage réticulaire dérivé de la protéine Cytochrome b5 Humain), déléetée de son domaine d'adressage membranaire C-terminal (Nrh-dTM) ou de son domaine BH4 N-terminal (Nrh-dBH4).

10

(B) Test d'apoptose (SR-FLICA) en réponse à 10 μ M de Thapsigargine pendant 24h dans des cellules HeLa transfectées par le vecteur vide pCS2+ ou les constructions codant pour Nrh, Nrh-ActA, Nrh-cb5, dTM ou dBH4 (N=3). ***, p<0.001 ; **, p<0.01 ; n.s. p>0.1 (Student t-test)

15 **Figure 5 :**

(A) Schéma du peptide Nrh 1-23 et des mutants ponctuels construits à partir du domaine BH4 de Nrh, fusionnés avec la séquence d'adressage Cb5.

(B) Quantification de l'interaction Nrh-IP3R1 par des expériences d'IP par anticorps anti-HA dans des cellules HeLa transfectées des plasmides codant pour Flag-Nrh, HA-hBD et les différents mutants ponctuels du peptides Nrh 1-23 taggés Flag avec un ratio 1 : 2 (N=3).

20

(C) Test d'apoptose (SR-FLICA) en réponse à 10 μ M de Thapsigargine pendant 24h dans des cellules HeLa transfectées par le vecteur vide pCS2+ ou les constructions codant pour Nrh 1-23, Nrh 1-23 Y16F ou Nrh 1-23 C20A (N=3). ***, p<0.001 ; **, p<0.01 ; n.s. p>0.1 (Student t-test)

25 **Figure 6 :**

(A) Séquences des peptides synthétiques Nrh 1-23 et Nrh 1-23 Y16F fusionnés à un domaine TAT d'internalisation par l'intermédiaire d'un espaceur (linker), et couplés à un fluorochrome (FITC) en N-terminal.

(B) Spectres de dichroïsme circulaire des peptides TAT-Nrh 1-23 et TAT-Nrh 1-23 Y16F décrits en figure 6A, solubilisés dans [H₂O – 0.1 % acide trifluoroacétique] à une concentration de 80 μ M dans 20 % de trifluoroéthanol, montrant pour chacun des peptides une signature

30

caractéristique d'une structure en hélice alpha. Le terme « Wavelength » désigne la longueur d'onde.

Figure 7 :

(A) Expériences de Proximity Ligation Assay (PLA) permettant de détecter l'interaction entre les protéines endogènes Nrh et IP3R1 dans les cellules MDA-MB-231.

(B) Test d'apoptose (SR-FLICA) en réponse à 10 μ M de Thapsigargin pendant 36h dans des cellules MDA-MB-231 incubées avec le peptide TAT-Nrh 1-23, ou TAT-Nrh 1-23 Y16F, après un flash lumineux (λ 488 nm) ou non (control), destiné à rompre les endosomes contenant les différents peptides (N=3). ***, p<0.001 ; **, p<0.01 ; n.s. p>0.1 (Student t-test)

Figure 8 : Alignement des séquences en aminoacides issues du domaine BH4 de différents homologues de la protéine Nrh : Nrz (orthologue chez *Danio Rerio*, SEQ ID NO. 19), NR-13 (orthologue chez *Gallus Gallus*, SEQ ID NO. 20), Bcl-2 L10 souris (orthologue chez *Mus Musculus*, SEQ ID NO. 21), Bcl-2 L10 Humain (Nrh, SEQ ID NO. 22), Bcl-2 (SEQ ID NO. 23), Bcl-xL (SEQ ID NO. 24), Bcl-A1 (SEQ ID NO. 25), et Bcl-W (SEQ ID NO. 26, homologues humains). Les acides aminés critiques pour l'interaction Bcl-2 L10/Nrh-IP3R1 sont mis en évidence par des flèches.

Figure 9 : Schéma de l'influx calcique et de l'apoptose contrôlés par Bcl-2 L10/Nrh.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au domaine de liaison au ligand IP3 ('domaine BD') d'au moins l'un des récepteurs IP3R.

La figure 9 présente schématiquement le rôle de la protéine Bcl-2 L10/Nrh dans les processus d'influx calcique cytosolique et dans l'apoptose.

En absence de Bcl-2 L10/Nrh, l'élévation de calcium cytosolique local entraîne l'import de calcium dans la mitochondrie via les canaux VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) et MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). En cas d'excès de calcium, la membrane mitochondriale externe peut se rompre, et on assiste alors au relargage du cytochrome c. Le cytochrome c déclenche l'activation du complexe Apaf-1/Caspase-9 qui va conduire de manière irréversible à la mort cellulaire par apoptose.

Dans des cellules tumorales soumises à un traitement destiné à induire l'apoptose desdites cellules, et lorsque la protéine Bcl-2 L10 est présente, son domaine BH4 interagit avec le récepteur IP3R1 pour réguler négativement la signalisation calcique.

5 En présence d'un inhibiteur compétitif qui déstabilise l'interaction entre Bcl-2 L10 et IP3R, désigné « Nrh 1-23 peptide », la protéine Bcl-2 L10 ne peut plus se lier à IP3R1 et ainsi l'élévation de calcium cytosolique local est rétablie et la cellule peut répondre normalement au traitement, et ainsi entrer dans le processus d'apoptose.

Récepteurs IP3R

10 Trois types de récepteurs IP3R ont été décrits chez les vertébrés : les séquences protéiques de chaque type IP3R1, IP3R2 et IP3R3 présentent une identité de 60 à 80 % avec leurs homologues sur la séquence totale, mais ce pourcentage d'identité est bien supérieur pour des régions spécifiques telles que la poche de liaison du ligand IP3, et le domaine définissant le canal pour le passage des ions calcium.

15 La base de données Genbank liste les séquences suivantes identifiées chez l'espèce humaine :

- Récepteur de type 1 à l'inositol 1,4,5-trisphosphate / isoforme 1, numéro d'accès: NP_001093422.2, 2710 acides aminés ;
- Récepteur de type 1 à l'inositol 1,4,5-trisphosphate / isoforme 2, numéro d'accès: NP_002213.5, 2695 acides aminés;
- 20 - Récepteur de type 1 à l'inositol 1,4,5-trisphosphate / isoforme 3, numéro d'accès : NP_001161744.1, 2743 acides aminés ;
- Récepteur de type 2 à l'inositol 1,4,5-trisphosphate, numéro d'accès: NP_002214.2, 2701 acides aminés ;
- Récepteur de type 3 à l'inositol 1,4,5-trisphosphate, numéro d'accès: 25 NP_002215.2, 2671 acides aminés.

Les trois types, bien que présentant des affinités variables pour le ligand IP3, présentent la même fonction biologique, et se distinguent essentiellement par une expression tissulaire différente (Mikoshiba, 2007).

30 Dans la présente invention, le terme général « IP3R » est utilisé pour désigner au moins l'un des types IP3R1, IP3R2 et IP3R3. Ainsi, les expressions « liaison à au moins l'un

des types du récepteur IP3R », « liaison au récepteur IP3R » et « liaison à l'un des récepteurs IP3R » sont utilisées indifféremment et désignent la même interaction.

5 Selon un aspect particulier de mise en œuvre de l'invention, le type de récepteur IP3R dont la liaison avec Bcl-2 L10 est inhibée est une protéine humaine, et plus particulièrement est l'une des isoformes de la protéine hIP3R1, dont la structure est représentée en figure 1.

10 Le domaine de liaison au ligand IP3 a été extensivement étudié. Il est également dénommé « domaine BD » pour 'binding domain' et est représenté en figure 1. Situé en zone N-terminale, il est constitué d'une portion allant du résidu 226 au résidu 565 dans la protéine humaine (Yoshikawa *et al.*, 1996).

Au sens de l'invention, on entend par « inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au domaine de liaison au ligand IP3 d'au moins l'un des types du récepteur IP3R » un composé capable d'inhiber ou de déstabiliser complètement ou partiellement cette liaison entre Bcl-2 L10 et au moins l'un des types de récepteur IP3R.

15 Les expressions « inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au récepteur IP3R », « inhibiteur compétitif de la liaison Bcl-2 L10/récepteur IP3R » et « inhibiteur selon l'invention » sont utilisées dans la présente demande pour désigner l'inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand IP3 d'au moins l'un des types du récepteur IP3R.

20 Le terme « inhibiteur compétitif » désigne le fait que l'inhibiteur est capable de se fixer sur le domaine de liaison au ligand IP3, c'est-à-dire le domaine BD de IP3R (voir figure 1), et d'entrer ainsi en compétition avec la protéine Bcl-2 L10 dont le domaine BH4 interagit avec cette zone du récepteur IP3R, inhibant ainsi la liaison Bcl-2 L10/IP3R.

25 Une telle liaison Bcl-2 L10/IP3R peut être quantifiée selon différentes techniques bien connues de l'homme du métier, et notamment par des expériences d'immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques, selon la technique décrite dans l'exemple 4 (figure 5B).

Cette liaison Bcl-2 L10/IP3R peut également être quantifiée par des expériences dites « de TR-FRET » (Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer), ou par des expériences de polarisation de fluorescence.

Les inventeurs ont également montré que cette liaison Bcl-2 L10/IP3R peut être quantifiée *in situ* sur des cellules ou tissus fixés à l'aide de la technique de PLA (Proximity Ligation Assay, Figure 7A).

5 L'inhibition de la liaison Bcl-2 L10/IP3R se caractérise par une réduction quantitative de ladite liaison Bcl-2 L10/IP3R.

Selon un aspect particulier de l'invention, la réduction de la liaison de Bcl-2 L10 avec l'un des récepteurs IP3R est d'au moins 30 % par rapport à la valeur chiffrée de la liaison normalement observée dans la cellule concernée. En particulier, cette diminution de la liaison Bcl-2 L10/IP3R peut être d'au moins 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, voire de
10 100 % c'est-à-dire que plus aucune interaction entre Bcl-2 L10 et IP3R n'est observée.

Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au domaine de liaison au ligand d'au moins l'un des récepteurs IP3R se caractérise par sa fonction qui correspond à une inhibition quantitative de ladite liaison Bcl-2 L10/IP3R d'au moins 60 %, voire d'au moins 80 %, par exemple telle qu'évaluée selon la
15 méthode décrite à l'exemple 4.

Protéine Bcl-2 L10

Au sens de l'invention, le terme « protéine Bcl-2 L10 » désigne toute protéine étant identifiée comme étant une isoforme ou un homologue de la protéine humaine « Bcl-2 like 10 », enregistrée dans GenBank sous le numéro d'accès AAG00503.1, et présentant une
20 séquence de 204 acides aminés. Cette désignation Bcl-2 L10 est utilisée dans la présente demande indifféremment avec les autres désignations de la même protéine, Bcl2-B ou Nrh.

La séquence de la protéine Bcl-2 L10 est bien conservée entre les espèces mammifères. L'alignement des domaines BH4 de la protéine de souris et de la protéine humaine ont notamment permis de déterminer que l'arginine en position 6, et la tyrosine en
25 position 16, sont conservées (voir figure 8).

Comme indiqué précédemment, cette protéine a de nombreux rôles, dont certains sont encore inconnus. Ainsi, une stratégie thérapeutique qui viserait à éliminer totalement l'expression de cette protéine serait potentiellement dangereuse, au vu des potentiels effets négatifs qui pourraient découler de l'absence totale d'expression de cette protéine.

La présente invention est relative spécifiquement à un inhibiteur compétitif qui empêche la fixation de la protéine Bcl-2 L10 au récepteur IPR3, et qui ne bloque que les effets de Bcl-2 L10 sur ce récepteur.

Inhibiteur compétitif comprenant un domaine peptidique

5 Un inhibiteur compétitif destiné à déstabiliser la liaison Bcl-2 L10/IP3R peut être sous plusieurs formes, et notamment sous la forme d'une molécule protéique, notamment un peptide chimère, ou d'un acide nucléique, tel qu'un aptamère nucléique, se liant spécifiquement au domaine BD d'au moins l'un des types de IP3R.

10 Selon un aspect préféré de l'invention, cet inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au récepteur IP3R comprend un domaine peptidique.

Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 au récepteur IP3R comprend un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 1 [RERTELLADY], les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.

15 Les inventeurs ont mis en évidence que cet inhibiteur permet d'inhiber spécifiquement les effets de Bcl-2 L10 sur l'ouverture du canal calcique IP3R, et donc de lever l'inhibition de la libération de calcium dans le cytosol.

20 Au sens de l'invention, l'expression « la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 1 » indique que la séquence du domaine peptidique présente au moins 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 100 % d'identité en acides aminés avec ladite séquence de référence.

25 Afin de déterminer le pourcentage d'identité de deux séquences d'acides aminés, les séquences seront alignées pour permettre une comparaison optimale. Des espaces (gap) peuvent être introduits dans l'une ou l'autre des séquences à aligner afin de permettre un alignement optimal. Le pourcentage d'identité des deux séquences d'acides aminés comparées peut être obtenu comme décrit dans le livre de D. Voet et J.G. Voet, *Biochimie* (2nd Edition, De Boeck & Larcier, 2005, section 7.4, paragraph B).

30 Cette détermination d'identité peut se faire au moyen d'algorithmes de comparaison tels que l'algorithme d'alignement global de Needleman-Wunsch ou celui de Smith-Waterman. Les alignements peuvent être réalisés notamment avec les logiciels

CLUSTAL W ou BLAST P, selon les paramètres par défaut ou adaptés par l'homme du métier.

Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif comprend un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence
5 SEQ ID NO. 2 [MADPLRRERTELLLADYLGCARE] ou avec la séquence SEQ ID NO. 3 [ADPLRRERTELLLADYLGCARE], les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.

Au sens de l'invention, l'expression « la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 2 ou 3 » indique que la séquence du domaine
10 peptidique présente au moins 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 100 % d'identité en acides aminés avec ladite séquence de référence.

Dans les exemples de la présente demande, un peptide consistant en cette séquence
15 SEQ ID NO. 2 est désigné par le terme « Nrh 1-23 », et correspond au domaine BH4 de la protéine humaine Bcl-2 L10.

Ce terme « Nrh 1-23 » peut également désigner un peptide consistant en la séquence SEQ ID NO. 3, identique à la SEQ ID NO. 2 à l'exception de la méthionine en première position, qui est optionnelle, comme cela est bien connu par l'Homme du métier. En effet, la présence ou non de la méthionine en premier acide aminé ne modifie pas la fonction
20 des peptides.

Différentes constructions de peptides ont été réalisées afin de déterminer les acides aminés essentiels pour la fixation compétitive de cet inhibiteur sur le domaine BD du récepteur IP3R.

Les différentes séquences étudiées dans les exemples de la présente demande sont
25 listées dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

Numéro SEQ	Description	Séquence
SEQ ID NO. 1	Domaine minimal de liaison aux IP3Rs	<u>R</u> ERTE <u>L</u> LLAD <u>Y</u>
SEQ ID NO. 2	Domaine BH4 de Bcl2 L10, permettant la fixation à IP3R (Nrh 1-23)	MADPL <u>R</u> ERTE <u>L</u> LLAD <u>Y</u> LG <u>C</u> A <u>R</u> E
SEQ ID NO. 3	Domaine de liaison aux IP3Rs sans la méthionine	ADPL <u>R</u> ERTE <u>L</u> LLAD <u>Y</u> LG <u>C</u> A <u>R</u> E
SEQ ID NO. 4	TAT-espaceur-domaine de liaison aux IP3Rs sans méthionine	RKKRRQRRRGGSGGADPL <u>R</u> ERTE LLAD <u>Y</u> LG <u>C</u> A <u>R</u> E
SEQ ID NO. 5	Domaine de liaison mute, non fonctionnel 'Nrh 1-23 R6A'	MADPL <u>A</u> ERTE <u>L</u> LLAD <u>Y</u> LG <u>C</u> A <u>R</u> E
SEQ ID NO. 6	Domaine de liaison mute, non fonctionnel 'Nrh 1-23 Y16F'	MADPL <u>R</u> ERTE <u>L</u> LLAD <u>F</u> LG <u>C</u> A <u>R</u> E
SEQ ID NO. 7	Domaine de liaison mute, fonctionnel 'Nrh 1-23 D15A'	MADPL <u>R</u> ERTE <u>L</u> LLAA <u>Y</u> LG <u>C</u> A <u>R</u> E
SEQ ID NO. 8	Domaine de liaison mute, fonctionnel 'Nrh 1-23 C20A'	MADPL <u>R</u> ERTE <u>L</u> LLAD <u>Y</u> LG <u>Y</u> A <u>A</u> R <u>E</u>

Ainsi, l'inhibiteur compétitif selon l'invention comprend préférentiellement un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité, et préférentiellement au moins 90 % d'identité, avec la séquence SEQ ID NO. 1 ou avec la séquence SEQ ID NO. 2 ou avec la séquence SEQ ID NO. 3, les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.

Selon une mise en œuvre de l'invention, l'inhibiteur compétitif comprend un tel domaine peptidique dont la séquence, présentant le pourcentage d'identité requis, est constituée de 10 à 50 acides aminés, préférentiellement de 11 à 40 acides aminés, plus préférentiellement de 20 à 30 acides aminés, et de manière tout à fait préférée a une longueur comprise entre 22 et 28 acides aminés, les bornes indiquées ci-dessus étant comprises dans l'intervalle.

Plusieurs séquences pour un tel domaine peptidique, présentant au moins 80 % d'identité avec la séquence montrée en SEQ ID NO. 1, peuvent être envisagées. En effet, pour deux domaines peptidiques d'une longueur de 11 acides aminés, dès lors que 9 acides aminés sont identiques entre les deux séquences, le pourcentage d'identité entre ces deux séquences peptidiques est de 81,81 % d'identité.

On peut citer des exemples tels que dans le tableau 2 ci-dessous, cette liste étant bien entendu non limitative, de domaines peptidiques présentant au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 1, où X représente n'importe quel acide aminé choisi parmi les vingt acides aminés connus :

Tableau 2

Numéro SEQ	Séquence
SEQ ID NO. 9	<u>R</u> RETELLXXDY
SEQ ID NO. 10	<u>R</u> ERTXXLLADY
SEQ ID NO. 11	<u>R</u> EXTELLLAXY

Selon un aspect particulier de l'invention, ledit inhibiteur compétitif comprend un domaine peptidique dont la séquence consiste en une séquence choisie parmi l'une des séquences SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10 ou SEQ ID NO. 11.

Selon une autre mise en œuvre de l'invention, ledit inhibiteur compétitif consiste en un domaine peptidique dont la séquence consiste en l'une des séquences SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10 ou SEQ ID NO. 11.

Selon cette mise en œuvre, un tel inhibiteur compétitif, sous la forme d'un peptide, pourra être produit directement par synthèse chimique, ou synthétisé au sein de la cellule, grâce à la machinerie cellulaire, à partir d'un plasmide ou d'un vecteur comportant une séquence d'acide nucléique codant pour l'une des séquences peptidiques citées ci-dessus. Ledit plasmide ou vecteur aura préalablement été introduit dans la cellule par une technique classique de transfection. Avantageusement, le peptide synthétisé au sein de la cellule sera fusionné avec une séquence d'adressage particulière, comme cela est présenté ci-après.

Structure de l'inhibiteur pour faciliter son passage à travers les membranes cellulaires

Comme précédemment exposé, le récepteur IP3R est situé dans la membrane du réticulum endoplasmique. Ainsi, un inhibiteur compétitif doit pouvoir atteindre ladite membrane afin de se lier au récepteur IP3R.

Il est donc important que ledit inhibiteur compétitif, lorsqu'il est administré à une personne, par exemple par voie sanguine, puisse traverser la membrane cellulaire et ainsi être présent dans le cytosol où il pourra se fixer au récepteur IP3R. Or, les membranes cellulaires sont imperméables aux molécules hydrophiles telles que les peptides.

Le problème de l'entrée dans les cellules vivantes des peptides, et de leur accès aux divers compartiments intracellulaires, en particulier le compartiment cytoplasmique, revêt une grande importance, notamment pour leur utilisation thérapeutique.

Pour faciliter le transport d'un peptide à travers une membrane biologique, trois techniques sont principalement mises en œuvre :

- l'utilisation d'un composé administré en même temps que le peptide, dont la présence facilite le transport d'un peptide à travers les membranes cellulaires ; ou bien
- l'utilisation de structures d'encapsulation du peptide, telles que des liposomes ou des polymères ; ou bien
- l'utilisation d'un composé d'adressage, fusionné en N-terminal ou en C-terminal du peptide, pour faciliter son passage à travers les membranes cellulaires et/ou le diriger vers des structures cellulaires spécifiques.

Ces trois techniques peuvent être utilisées indépendamment l'une de l'autre, ou être utilisées simultanément.

L'utilisation de structures d'encapsulation, permettant à la fois la protection des peptides vis-à-vis d'une dégradation enzymatique, et le passage des peptides hydrophiles à travers la barrière hydrophobe, est bien connue de l'Homme du métier.

5 Les liposomes sont des structures vésiculaires composés de couches lipidiques, permettant d'encapsuler des composés hydrophiles à l'intérieur des lipides. Les liposomes sont de plus en plus utilisés en thérapie humaine, comme vecteurs de médicaments.

Les polymères les plus utilisés pour l'encapsulation de composés actifs hydrophiles (peptides) sont les dérivés des acides lactiques et glycoliques (PLGA, PLA), l'éthyl-cellulose, et la poly-epsilon-caprolactone, qui sont biodégradables

10 ***Composés d'adressage***

Un composé d'adressage, ci-après désigné [ADR], fusionné à un domaine peptidique ayant une fonction d'inhibiteur compétitif peut être une molécule peptidique ou non.

15 Le composé d'adressage fusionné au peptide d'intérêt peut être en particulier toute séquence d'acides aminés facilitant et/ou médiant le transport dudit peptide de l'extérieur d'une cellule vers son intérieur. De telles séquences sont connues de l'homme du métier. Elles sont généralement constituées de 2 à 20 acides aminés. Ladite séquence permettant la pénétration dudit peptide dans une cellule, peut être choisie selon le type cellulaire de ladite cellule, afin d'optimiser l'efficacité de pénétration.

20 Parmi ces composés d'adressage, on peut citer notamment le peptide issu de la protéine TAT du rétrovirus HIV de séquence telle que montrée en SEQ ID NO. 12 (RKKRRQRRR), la pénétratine constituée d'une séquence telle que montrée en SEQ ID NO. 13 (RQIKIWFQNRRMKWKK), la séquence dite « séquence X7/11R », désignant toute séquence peptidique de 7 à 20 acides aminés contenant entre sept et onze
25 résidus arginine (7/11R), dans laquelle les résidus arginine peuvent être placés de façon aléatoire au sein de ladite séquence, et les peptides de type homéodomaine.

On peut citer également des composés d'adressage spécifiques, tels que le domaine d'adressage mitochondriale *ActA* de *L. monocytogene*, ou le domaine d'adressage au réticulum endoplasmique *cb5*, dérivé de la protéine du Cytochrome b5 Humain.

Selon un mode de réalisation préféré, le composé d'adressage permettant la pénétration dudit inhibiteur compétitif dans une cellule est le peptide issu de HIV-TAT de séquence SEQ ID NO. 12.

5 Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, le domaine d'adressage HIV-TAT fusionné au peptide peut être dimérisé, pour augmenter la biodisponibilité du peptide au sein de la cellule, comme cela est présenté dans la demande internationale WO 2015/038662.

Structure de l'inhibiteur compétitif de l'invention

10 Selon l'invention, l'inhibiteur compétitif peut être composé de plusieurs domaines, peptidiques ou non, couplés les uns aux autres.

En particulier, l'inhibiteur compétitif peut se présenter selon la structure suivante :
[ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z où

- ADR désigne un composé d'adressage,
 - ESP désigne un espaceur,
 - 15 • DOM est un domaine peptidique tel que défini précédemment,
 - et SADR désigne un domaine d'adressage intracellulaire spécifique,
- et où x,y et z sont égal à 0 ou 1, indépendamment entre eux.

Le composé d'adressage sera en particulier l'un des composés cités ci-dessus.

20 Un espaceur, aussi appelé espaceur moléculaire, désigne un segment assurant la liaison entre deux parties de molécule. Au sens de la présente invention, il s'agit d'un domaine destiné à séparer le domaine peptidique actif et la séquence d'adressage, qui par son hydrophobicité pourrait altérer la fonction du domaine peptidique actif.

25 Cet espaceur aussi dénommé « linker » ou « linking moiety » peut être une molécule peptidique ou non. S'il s'agit d'un peptide, sa taille est d'au moins 3 acides aminés de longueur et d'au plus 50 acides aminés de longueur. De préférence, la taille du peptide espaceur est comprise entre 5 et 30 acides aminés de longueur, et tout à fait de préférence entre 5 et 20 acides aminés de longueur.

Les espaceurs sont généralement classifiés en trois catégories : les espaceurs flexibles, les espaceurs rigides et les espaceurs clivables *in vivo*. Tous les espaceurs listés dans

la revue de (Chen *et al.*, 2013), sont susceptibles d'être utilisés dans la structure de l'inhibiteur compétitif selon l'invention.

Cet espaceur situé entre le domaine peptidique actif et la séquence d'adressage est maintenu par des liaisons qui doivent être suffisamment stables pour maintenir la molécule de structure globale [ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z au cours de la traversée de la membrane cytoplasmique et de la capture endosomale. Par la suite, la liaison peut ne plus être nécessaire, et la molécule peut être clivée au niveau de l'espaceur.

Selon une mise en œuvre de l'invention, l'espaceur appartient à la catégorie « clivable *in vivo* », et la structure [ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z est clivée au sein de la cellule. Selon une autre mise en œuvre de l'invention, l'espaceur est de type flexible et est composé de résidus glycine et sérine.

Les exemples présentés ci-après décrivent des inhibiteurs compétitifs de structure [ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z, où y=1, comprenant un tel espaceur flexible de séquence telle que montrée en SEQ ID NO. 14 (GGSGG).

Les différentes séquences citées ci-dessus sont rassemblées dans le tableau 3 :

Tableau 3

Numéro de séquence	Description	Séquence
SEQ ID NO. 12	Peptide HIV-TAT	RKKRRQRRR
SEQ ID NO. 13	pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK
SEQ ID NO. 14	Espaceur	GGSGG
SEQ ID NO. 15	Domaine d'adressage au RE du Cytochrome b5 humain	WWTNWVIPAISAVAVALMYRLYMAED
SEQ ID NO. 16	Domaine d'adressage au RE « KDEL »	KDEL
SEQ ID NO. 17	Domaine d'adressage au RE « KKMP »	KKMP
SEQ ID NO. 18	TAT-linker-domaine de liaison aux IP3Rs sans méthionine-séquence adressage Cb5	RKKRRQRRRGGSGGADPLRERTE LLLADYLGYCAREWWTNWVIPAISAVAV ALMYRLYMAED

Selon un aspect particulier de l'invention, la séquence d'acides aminés de l'espaceur est également un marqueur pour la détection ou la purification du peptide. Par exemple, le peptide espaceur peut être constitué par le peptide « HA TAG ».

5 Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est construit selon la structure suivante : $[ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z$ où

- ADR désigne un composé d'adressage,
- ESP désigne un espaceur,
- DOM est un domaine peptidique présentant l'une des séquences choisies parmi SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, et SEQ ID NO. 11,
- SADR désigne un domaine peptidique d'adressage intracellulaire spécifique,
- et où x, y et z sont égaux à 1.

15 Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est construit selon la structure suivante : $[ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z$ où

- ADR désigne un composé d'adressage,
- ESP désigne un espaceur,
- DOM est un domaine peptidique présentant l'une des séquences SEQ NO.2 ou NO. 3.
- SADR désigne un domaine peptidique d'adressage intracellulaire spécifique
- et où x, y et z sont égaux à 1.

25 Selon un autre aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est construit selon la structure suivante : $[ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z$ où ADR désigne un composé d'adressage constitué d'un peptide issu de TAT-HIV, de séquence SEQ ID NO.12, et où x est égal à 1.

Selon un autre aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est construit selon la structure suivante : $[ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z$ où ESP désigne un espaceur de séquence SEQ ID NO. 14, et où y est égal à 1.

5 Selon un autre aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est construit selon la structure suivante : $[ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z$ où ESP désigne un espaceur de séquence SEQ ID NO. 14, et où z est égal à 1.

10 Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est constitué exclusivement de domaines peptidiques, et est notamment caractérisé en ce que les domaines ADR, ESP et SADR sont des domaines peptidiques.

Selon encore un autre aspect préféré de l'invention, l'inhibiteur compétitif consiste en un peptide présentant la séquence peptidique représentée en SEQ ID NO. 4.

Selon encore un autre aspect préféré de l'invention, l'inhibiteur compétitif consiste en un peptide présentant la séquence peptidique représentée en SEQ ID NO. 18.

15 ***Utilisation de cet inhibiteur compétitif en tant que médicament***

La présente invention est également relative à un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand d'au moins l'un des récepteurs IP3R, pour son utilisation en tant que médicament.

20 En effet, les inventeurs ont mis en évidence des effets thérapeutiques de cet inhibiteur compétitif, qui empêche la fixation de la protéine Bcl-2 L10 sur le récepteur IP3R, et ainsi lève l'inhibition d'ouverture du canal calcique que fait peser Bcl-2 L10 sur le récepteur IP3R.

25 En rendant le récepteur IP3R indépendant de la présence de Bcl-2 L10, celui-ci redevient sensible à d'autres signaux, et notamment aux changements de la concentration de son ligand l'IP3.

Ainsi, l'inhibiteur compétitif selon l'invention peut être utilisé en tant que médicament pour toutes sortes d'applications thérapeutiques, notamment dans les pathologies liées directement ou indirectement au fonctionnement et/ou à la régulation du récepteur IP3R.

30 Ce médicament est principalement destiné à l'Homme mais peut également être utilisé chez les animaux vertébrés, en particulier chez les animaux mammifères.

Dans son utilisation en tant que médicament, il est entendu que la quantité d'inhibiteur compétitif à administrer peut varier en fonction du poids du patient considéré et de l'effet désiré, ainsi que de la posologie à adapter selon la fréquence du traitement. Ces dosages sont bien connus de l'homme du métier et seront aisément déterminables par celui-ci, en s'appuyant sur ses connaissances générales.

Un inhibiteur compétitif conforme à l'invention, peut être administré par toute voie convenable, telle que la voie orale, buccale, sub-linguale, rectale, parentérale, intrapéritonéale, intradermale, transdermale, intra-trachéale, topique, ou ophtalmique.

Une administration par injection peut être effectuée, par exemple, par voie intrapéritonéale, intradermique, sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire.

Toute voie muqueuse peut également être mise en œuvre, telle que la voie génito-urinaire, ano-rectale, respiratoire, bucco-nasale, sublinguale, ou une combinaison de celles-ci.

Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif selon l'invention est utilisé, en tant que médicament, dans le traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

On entend par « traiter le cancer » le fait de faire régresser, voire disparaître complètement, du corps du patient toutes les cellules cancéreuses et en particulier la tumeur d'origine.

Au sens de l'invention, l'expression « cancer dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10 » recouvre de nombreux types de cancers et notamment les tumeurs du sein, de la prostate, du poumon, et les tumeurs hématopoïétiques telles que les leucémies aiguës myéloblastiques et les syndromes myélodysplasiques.

Selon un aspect particulier de l'invention, l'inhibiteur compétitif est utilisé en tant que médicament en combinaison avec au moins un produit de chimiothérapie, dans le traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

Au sens de l'invention, par « produit de chimiothérapie », on entend un composé thérapeutique utilisé dans le traitement du cancer, destiné à induire l'apoptose des cellules cancéreuses. De tels produits sont bien connus de l'homme du métier.

Selon un aspect particulier de l'invention, ledit produit de chimiothérapie sera choisi parmi la liste comprenant les produits dénommés Cisplatine, Carboplatine, Oxaliplatine, Bendamustine, Dacarbazine, Témazolomide, Estramustine, Methotrexate, Azacytidine,

Capécitabine, Cytarabine, Fluorouracile, Gemcitabine, Tégafur, Pémétréxed, Nélarabine, Hydroxycarbamide, Raltitrexed, Doxorubicine, Epirubicine, Mitoxantrone, Daunorubicine, Idarubicine, Bléomycine, Mitomycine, Dactinomycine, Irinotécan, Topotécan, Etoposide, Docétaxel, Paclitaxel, Thapsigargine, et leurs dérivés.

5 Au sens de l'invention, l'expression « utilisation en combinaison avec au moins un produit de chimiothérapie » indique que les deux composés thérapeutiques, l'inhibiteur compétitif et le produit de chimiothérapie, peuvent être utilisés de manière concomitante ou séquentielle, et en particulier leur administration peut être réalisée de manière séparée dans le temps, au cours du traitement d'un patient.

10 L'invention concerne également un produit de chimiothérapie, pour son utilisation en combinaison avec au moins un inhibiteur compétitif tel que décrit ci-dessus, dans le traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

 L'invention concerne également un inhibiteur compétitif utilisé en tant que médicament, en combinaison avec au moins un produit de chimiothérapie, ledit inhibiteur
15 compétitif étant un modulateur de la réponse aux traitements de chimiothérapie des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

 Le terme « modulateur de la réponse » désigne la capacité de l'inhibiteur compétitif selon l'invention d'optimiser les effets thérapeutiques du ou des produits de chimiothérapie, notamment des produits utilisés pour le traitement des cancers dont les cellules
20 expriment la protéine Bcl-2 L10. Ainsi lorsque l'inhibiteur compétitif est utilisé en tant que médicament, en combinaison avec au moins un produit de chimiothérapie, dans le cadre du traitement d'un cancer dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10, ledit traitement avec le produit de chimiothérapie sera plus efficace contre ledit cancer.

 L'expression « efficace contre ledit cancer » désigne notamment le fait que les
25 quantités de produits de chimiothérapie utilisées pour le traitement seront moindres que celles habituellement utilisées, lorsque l'inhibiteur compétitif est utilisé comme médicament en combinaison avec ledit produit de chimiothérapie.

 L'expression « efficace contre ledit cancer » peut également désigner le fait que le traitement avec ledit produit de chimiothérapie sera plus court que celui habituellement réalisé
30 chez un patient atteint d'un cancer dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10, lorsque l'inhibiteur compétitif est utilisé comme médicament en combinaison avec ledit produit de chimiothérapie.

L'invention concerne également un procédé pour traiter un cancer dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10, comprenant une étape d'administration d'un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand d'au moins l'un des récepteurs IP3R à un patient atteint dudit cancer.

- 5 L'invention concerne également un procédé pour traiter un cancer dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10, comprenant une étape d'administration d'un inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand d'au moins l'un des récepteurs IP3R, et une autre étape d'administration d'au moins un produit de chimiothérapie, à un patient atteint dudit cancer, les deux étapes d'administration pouvant être
10 concomitantes ou séquentielles.

Composition pharmaceutique

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, au moins un inhibiteur compétitif tel que décrit ci-dessus.

- 15 Selon une mise en oeuvre préférée, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, au moins un inhibiteur comprenant un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 1 [RERTELLLADY], les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.

- 20 Un tel inhibiteur peut notamment comprendre un domaine peptidique de séquence représentée en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 ou en SEQ ID NO. 18.

- Un tel inhibiteur peut également consister en un domaine peptidique de séquence telle que représentée dans l'une des séquences SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3,
25 SEQ ID NO.4, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 et SEQ ID NO. 18.

- Un inhibiteur compétitif de la liaison Bcl-2 L10/récepteur IP3R ou une composition pharmaceutique de l'invention peut être formulé(e) avec tout milieu ou véhicule pharmaceutiquement acceptable, et peut être formulé(e) sous toute forme solide, semi-solide,
30 liquide ou gazeuse, telle qu'un comprimé, une capsule, une gélule, une poudre, un granule, une émulsion, une suspension, un gel, une microsphère, ou une forme inhalée.

Selon un mode de réalisation, un inhibiteur compétitif de la liaison Bcl-2 L10/récepteur IP3R conforme à l'invention, ou une composition pharmaceutique de l'invention peuvent être formulé(e)s pour la voie orale, sous forme d'un comprimé, d'une capsule ou d'une gélule, à libération prolongé(e) ou contrôlé(e), d'une pilule, d'une poudre, d'une solution, d'une suspension, d'un sirop ou d'une émulsion.

Selon un autre mode de réalisation, un inhibiteur compétitif de la liaison Bcl-2 L10/récepteur IP3R conforme à l'invention, ou une composition pharmaceutique de l'invention peuvent être préparé(e)s en forme injectable. Un polypeptide ou un acide nucléique de l'invention peut être formulé avec différents véhicules, tels qu'un liposome ou un polymère de transfection.

Une composition pharmaceutique de l'invention peut de préférence comprendre un inhibiteur tel que défini dans la présente description, en suspension dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, par exemple un véhicule aqueux. Différents véhicules aqueux peuvent être utilisés, par exemple de l'eau, une solution tampon saline, une solution de glycine à 0,4 % ou 0,3 %, ou une solution d'acide hyaluronique.

Selon un aspect préféré de l'invention, la composition pharmaceutique comprend de plus un agent permettant de faciliter le transport des peptides à travers une membrane biologique, tel que par exemple le réactif CHARIOT™ Protein Delivery Reagent.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être stérilisée par toute méthode conventionnelle connue, telle que la filtration. La solution aqueuse résultante peut être conditionnée pour être utilisée en l'état, ou être lyophilisée. Une préparation lyophilisée peut être combinée avec une solution stérile avant utilisation.

Une composition pharmaceutique de l'invention peut comprendre tout excipient pharmaceutiquement acceptable requis, tels que des agents tampons ou des agents pour ajuster le pH ou l'isotonicité, et des agents mouillants. Une composition pharmaceutique selon l'invention peut également comprendre un ou plusieurs agents anti-oxydants, un ou plusieurs agents conservateurs, et éventuellement d'autres principes actifs de médicament.

Selon une mise en œuvre particulière, une composition pharmaceutique de l'invention comprend une quantité efficace de l'inhibiteur compétitif de l'interaction Bcl-2 L10 / IP3R.

Une quantité efficace d'un inhibiteur selon l'invention est une quantité qui, seule ou en combinaison avec des doses ultérieures, induit la réponse désirée, à savoir un effet

inhibiteur à l'égard de la liaison Bcl-2 L10/récepteur IP3R, et par voie de conséquence la levée de l'inhibition que Bcl-2 L10 fait peser sur la fonction de canal calcique du récepteur IP3R. La quantité efficace d'un tel inhibiteur peut dépendre d'un paramètre ou d'une pluralité de paramètres, tel que la voie d'administration, l'administration en dose unique ou multiple, des caractéristiques du patient, ce qui englobe l'âge, la condition physique, la taille, le poids et la présence d'affections ou de maladies. Ces paramètres et leurs influences sont bien connus de l'homme de l'art et peuvent être déterminés par toute méthode connue.

Ladite composition pourra être utilisée dans tout type de traitement, notamment dans le cadre de la prévention et/ou du traitement de tous les types de cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.

EXEMPLES

Exemple 1. Localisation cellulaire de la protéine Bcl-2 L10 (Nrh)

Des cellules humaines de carcinome mammaire MDA-MB-231 exprimant de manière endogène la protéine Bcl-2 L10/Nrh sont cultivées puis lysées. Plusieurs extraits sont déposés sur le gel : la fraction totale, la fraction mitochondriale (Mito), la fraction réticulaire (RE) et la fraction soluble obtenue après centrifugation à 100000G (S100). Les protéines vinculine, calnexine et F0F1 sont utilisées en témoin.

La localisation de la protéine Bcl-2 L10/Nrh dans le réticulum endoplasmique (RE) est clairement visualisée dans la figure 2, troisième colonne.

Exemple 2. Effets d'ARN interférents empêchant l'expression de la protéine Nrh, en présence ou non de Thapsigargine

Des cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de Nrh (si3-Nrh ou si6-Nrh), ou avec un siRNA contrôle (siSCR). Dans ces cellules, l'expression de Nrh est fortement diminuée.

48 heures après la transfection, les cellules sont incubées pendant 6 heures, 24 heures et 36 heures avec du DMSO (témoin) ou 10µM de Thapsigargine (THG). Les résultats sont présentés en figure 3. L'activité des Caspases 3 et 7 est mesurée en pourcentages. Une activité supérieure à 10 % indique que les cellules sont entrées dans le processus d'apoptose, ce qui est attendu en présence de Thapsigargine, un composé de chimiothérapie induisant

l'apoptose des cellules. Au contraire, en présence de DMSO, les cellules ne devraient pas présenter d'activité des caspases.

Or, en présence des ARN interférents bloquant l'expression de Bcl-2 L10/Nrh, même sans traitement à la Thapsigargine, les cellules incubées pendant 36h présentent une
5 activité caspase supérieure à 10 %.

Par ailleurs, en présence de Thapsigargine, les cellules transfectées avec les ARN interférents présentent une activité caspase bien supérieure à celle observée pour les cellules transfectées avec l'ARN interférent témoin.

Ainsi, l'absence d'expression de la protéine Bcl-2 L10/Nrh entraîne une nette
10 potentialisation des effets de la Thapsigargine, cet effet étant de plus en plus marqué au cours de la cinétique d'incubation.

Exemple 3. Effets de protéines mutantes ou de fusion, dérivées de Bcl-2 L10/Nrh, en présence ou non de Thapsigargine

Plusieurs constructions polypeptidiques ont été réalisées à partir du gène *nrh* :

- 15 - la protéine Bcl-2 L10/Nrh humaine sous sa forme naturelle et entière : Nrh-WT ;
- la protéine Bcl-2 L10/Nrh sous sa forme naturelle et entière, avec un composé d'adressage au réticulum endoplasmique dérivé de la protéine Cytochrome b5 Humain: Nrh-cb5,
- la protéine Bcl-2 L10/Nrh sous sa forme naturelle et entière, avec un composé
20 d'adressage à la mitochondrie ActA de *L. monocytogene* : Nrh-ActA,
- la protéine Bcl-2 L10/Nrh dont le domaine d'ancrage membranaire a été délété : Nrh-dTM,
- la protéine Bcl-2 L10/Nrh dont le domaine BH4, en N-terminal, a été délété : Nrh-dBH4.

25 Ces différentes protéines de fusion / protéines mutées sont présentées en figure 4A.

Les effets de ces différentes protéines ont été observés après transfection de cellules HeLa par le vecteur vide pCS2+, ou avec les constructions codant pour Nrh, Nrh-ActA, Nrh-cb5, dTM ou dBH4.

La mesure de l'activité Caspase dans ces cellules, traitées avec 10 μ M de Thapsigargine pendant 24h, est présentée en figure 4B.

Il apparait que l'activité caspase est fortement induite en présence de Thapsigargine, ce qui correspond à l'effet attendu. Lorsque la protéine Bcl-2 L10/Nrh-WT est surexprimée dans les cellules, cet effet est diminué de moitié ; cet effet est maintenu en présence d'une protéine Nrh adressé au réticulum endoplasmique, ou délété de son domaine d'ancrage membranaire.

Cependant, lorsque la protéine Bcl-2 L10/Nrh présente une délétion de son domaine BH4, ou qu'elle est adressée vers la mitochondrie, l'effet bloquant de l'apoptose n'est plus observé, le pourcentage de l'activité caspase étant maintenu au même niveau qu'en absence de cette protéine.

Il peut donc être conclu que la localisation de la protéine Bcl-2 L10/Nrh au niveau du réticulum endoplasmique, et la présence de son domaine BH4, sont indispensables pour obtenir l'effet bloquant l'apoptose induite par la Thapsigargine.

15 ***Exemple 4. Construction de différents peptides, potentiellement utilisables comme inhibiteurs compétitifs empêchant l'interaction Bcl-2 L10/IP3R, en présence ou non de Thapsigargine***

Plusieurs constructions peptidiques ont été réalisées à partir du peptide Nrh 1-23 dont la séquence est la suivante : MADPLRRTELLLADYLGCARE (SEQ ID NO. 2)

20 La figure 5A présente les différentes mutations ponctuelles réalisées, où le peptide Nrh 1-23 de séquence SEQ ID NO.2 est muté afin de créer les peptides Nrh R6A (SEQ ID NO. 5), Nrh D15A (SEQ ID NO. 7), Nrh Y16F (SEQ ID NO. 6) et Nrh C20A (SEQ ID NO. 8), qui sont fusionnés en C-terminal avec le domaine d'adressage intracellulaire cytochrome b5 (SEQ ID NO. 15).

25 La figure 5B présente la capacité de ces différents peptides à inhiber l'interaction de Bcl-2 L10/Nrh avec le domaine BD du récepteur IP3R1. Cette interaction est quantifiée par la technique d'immunoprécipitation, le domaine BD étant taggé avec un épitope HA, et la protéine Bcl-2 L10/Nrh avec un épitope Flag.

30 Des cellules HeLa sont transfectées avec des plasmides codant pour Flag-Nrh, HA-hBD et les différents mutants ponctuels du peptide Nrh 1-23 taggés Flag avec un ratio 1 : 2, et l'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-HA.

En absence de peptide, on observe l'interaction entre Flag-Nrh et HA-hBD. Cependant, lorsque l'on ajoute le plasmide codant pour le peptide Nrh 1-23 (SEQ ID NO.2), le peptide Nrh D15A (SEQ ID NO. 7) ou Nrh C20A (SEQ ID NO. 8) on peut visualiser sur le western-blot en figure 5B l'absence de la bande correspondant à la protéine Flag-Nrh, démontrant que ces peptides dissocient l'interaction Nrh/IP3R1. Au contraire, la bande correspondant à la protéine Flag-Nrh est toujours visible, bien que faiblement, en présence des peptides Nrh R6A (SEQ ID NO. 5) et Nrh Y16F (SEQ ID NO. 6).

Il peut donc être conclu que les résidus arginine en position 6 et tyrosine en position 16 sont critiques pour la fonction biologique du peptide Nrh 1-23 à dissocier l'interaction entre Nrh et IP3R1. Les résidus glutamate en position 15 et cystéine en position 20 ne sont quant à eux pas indispensables à la fonction du peptide Nrh 1-23.

La figure 5C montre les effets de la transfection de certains de ces différents peptides dans des cellules HeLa, les cellules témoins étant transfectées avec le vecteur vide pCS2+.

La mesure de l'activité Caspase dans ces cellules, traitées avec 10 μ M de Thapsigargine pendant 24h, est présentée en figure 5C.

Il apparait que dans les cellules témoins, l'activité caspase est induite en présence de Thapsigargine, ce qui correspond à l'effet attendu. Lorsque le peptide Nrh 1-23 (SEQ ID NO. 2) est présent, et donc inhibe l'interaction Bcl-2 L10/IP3R1, cet effet de la Thapsigargine est potentialisé, la caspase activité étant presque doublée ; cet effet est maintenu en présence d'un peptide Nrh C20A, mais disparaît lorsque la mutation ponctuelle est effectuée sur la tyrosine Y16.

Exemple 5. Constructions peptidiques d'inhibiteur compétitif conforme à l'invention, ou muté sur la tyrosine 16.

La figure 6A présente la construction peptidique « TAT Nrh 1-23 » telle que représentée en séquence SEQ ID NO. 4 ; et une construction hors invention, où la tyrosine 16 n'est pas conservée « TAT-Nrh 1-23 Y16F », comprenant l'association des séquences SEQ ID NO. 12 et 6.

La figure 6B présente des spectres de dichroïsme circulaire des peptides TAT-Nrh 1-23 et TAT-Nrh 1-23 Y16F, solubilisés dans un tampon [H₂O – 0.1 % acide trifluoroacétique] à une concentration de 80 μ M dans 20 % de trifluoroéthanol.

Les deux constructions peptidiques présentent la signature caractéristique d'une structure en hélice alpha. Ainsi, il est montré que la mutation ponctuelle Y16F, même si elle n'affecte pas la structure tridimensionnelle du peptide, affecte sa fonction biologique d'inhibiteur compétitif.

5 ***Exemple 6. Interaction entre les protéines endogènes Bcl-2 L10/Nrh et IP3R1 dans les cellules MDA-MB-231, en présence des constructions peptidiques selon l'invention (TAT Nrh 1-23) ou hors invention (TAT Nrh 1-23 Y16F)***

La figure 7A montre les résultats d'expériences de Proximity Ligation Assay (PLA).

10 Les cellules MDA-MB-231 sont incubées 4h avec le peptide TAT Nrh-1-23 (SEQ ID NO. 4) ou le peptide contrôle TAT-Nrh 1-23 Y16F (SEQ ID NO 12 et 6). Après 3 lavages des cellules, un laser à 488nm est utilisé pour exciter le fluorophore (FITC) présent dans les endosomes, rompre la membrane endosomale et libérer les peptides TAT-FITC dans le cytosol. Les cellules sont incubées 12h puis fixées, et l'interaction entre Nrh et IP3R1 est
15 quantifiée par PLA, en utilisant un anticorps primaire de lapin contre Nrh et un anticorps primaire de souris contre IP3R1. Cette étape est suivie par l'incubation avec un mélange d'anticorps secondaire anti-lapin et anti-souris, chacun couplé à une sonde nucléotidique complémentaire. Une étape de ligation puis d'amplification est alors réalisée en présence de nucléotides fluorescents, permettant d'amplifier un signal spécifique en cas de proximité
20 spatiale des sondes. Le signal de fluorescence, ou chaque point correspond à une interaction dans la cellule, est enregistré à l'aide d'un microscope à fluorescence Nikon NiE. Les images sont quantifiées par le logiciel Image J, et le score d'interaction est représenté sur le graphique en nombre de points par cellule (N=3).

On observe sur la figure 7A montrant la quantification de plusieurs expériences de
25 PLA un score de 80 ± 5 et 87 ± 6 points par cellules après incubation avec le tampon de dilution du peptide (Vehicle) ou le peptide TAT Nrh 1-23 en absence de flash à 488nm, et donc en absence de libération des peptides dans le cytosol.

En revanche, lorsque l'on utilise un flash à 488nm pour libérer le peptide TAT Nrh Y16F, le score tombe à 65 ± 5 , puis avec le peptide TAT Nrh 1-23 à 11 ± 1 points par cellule.

30 Selon cette technique de quantification, le pourcentage d'inhibition de l'interaction Nrh/IP3R1 est compris entre 18,75 % $((80-65)/80)$ et 25 % $((87-65)/87)$, selon le témoin négatif considéré en présence du peptide hors invention. En présence du peptide TAT

Nrh 1-23, le pourcentage d'inhibition de l'interaction Nrh/IP3R1 est égal à 86 % ou 87 %, en fonction du témoin négatif considéré.

On peut donc conclure par cette expérience quantitative que le peptide TAT Nrh 1-23 permet la dissociation efficace de l'interaction endogène entre Nrh et IP3R1, correspondant à une inhibition d'au moins 30 % de l'interaction Nrh/IP3R1, et que le peptide TAT Nrh Y16F n'affecte l'interaction que de manière très limitée, inférieure à la valeur limite de 30 %.

Exemple 7. Activité biologique des constructions peptidiques selon l'invention (TAT Nrh 1-23) ou hors invention (TAT Nrh 1-23 Y16F), en présence ou non de Thapsigargine

Les cellules MDA-MB-231, exprimant la protéine Bcl-2 L10 de manière endogène, sont incubées avec le peptide TAT-Nrh 1-23 (SEQ ID NO. 4), ou le peptide TAT-Nrh 1-23 Y16F (SEQ ID NO. 12 et 6), pendant 36h, après un flash lumineux ou non, destiné à rompre les endosomes contenant les différents peptides.

Les résultats sont présentés en figure 7B.

Lorsque les peptides sont relargués dans le cytosol, la construction peptidique selon l'invention agit sur les cellules en combinaison avec la Thapsigargine et permet d'obtenir une activité caspase de plus de 60 %.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brevets

WO 2012/031103

WO 2013/128089

5 WO 2015/038662

Articles scientifiques

1. Besbes S, Billard C. *First MCL-1-selective BH3 mimetics as potential therapeutics for targeted treatment of cancer*. Cell Death Dis. 2015 Jul 9;6
2. Arnaud E, Ferri KF, Thibaut J, Haftek-Terreau Z, Aouacheria A, Le Guellec D, Lorca T,
10 Gillet G. *The zebrafish bcl-2 homologue Nrz controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms*. Cell Death Differ. 2006 Jul;13(7):1128-37.
3. Popgeorgiev N, Bonneau B, Ferri KF, Prudent J, Thibaut J, Gillet G. *The apoptotic regulator Nrz controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca²⁺ trafficking in the zebrafish blastula*. Dev Cell. 2011 May 17;20(5):663-76.
15
4. Bonneau B, Nougarede A, Prudent J, Popgeorgiev N, Peyriéras N, Rimokh R, Gillet G. *The Bcl-2 homolog Nrz inhibits binding of IP3 to its receptor to control calcium signaling during zebrafish epiboly*. Sci Signal. 2014 Feb 11;7(312)
5. Krajewska M, Kitada S, Winter JN, Variakojis D, Lichtenstein A, Zhai D, Cuddy M, Huang
20 X, Luciano F, Baker CH, Kim H, Shin E, Kennedy S, Olson AH, Badzio A, Jassem J, Meinhold-Heerlein I, Duffy MJ, Schimmer AD, Tsao M, Brown E, Sawyers A, Andreeff M, Mercola D, Krajewski S, Reed JC. *Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies*. Clin Cancer Res. 2008 May 15;14(10):3011-21.
6. Cluzeau T, Robert G, Mounier N, Karsenti JM, Dufies M, Puissant A, Jacquél A, Renneville
25 A, Preudhomme C, Cassuto JP, Raynaud S, Luciano F, Auberger P. *BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacitidine in MDS and AML patients*. Oncotarget. 2012 Apr;3(4):490-501.

7. Rong YP, Aromolaran AS, Bultynck G, Zhong F, Li X, McColl K, Matsuyama S, Herlitz S, Roderick HL, Bootman MD, Mignery GA, Parys JB, De Smedt H, Distelhorst CW. *Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals*. Mol Cell. 2008 Jul 25;31(2):255-65.
- 5 8. Monaco G, Beckers M, Ivanova H, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. *Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L)-binding sites on type 1 IP(3) receptor*. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 9;428(1):31-5
9. Rong YP, Bultynck G, Aromolaran AS, Zhong F, Parys JB, De Smedt H, Mignery GA, Roderick HL, Bootman MD, Distelhorst CW. *The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 25;106(34):14397-402.
- 10 10. Zhong F, Harr MW, Bultynck G, Monaco G, Parys JB, De Smedt H, Rong YP, Molitoris JK, Lam M, Ryder C, Matsuyama S, Distelhorst CW. *Induction of Ca²⁺-driven apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by peptide-mediated disruption of Bcl-2-IP3 receptor interaction*. Blood. 2011 Mar 10;117(10):2924-34.
- 15 12. Lavik AR, Zhong F, Chang MJ, Greenberg E, Choudhary Y, Smith MR, McColl KS, Pink J, Reu FJ, Matsuyama S, Distelhorst CW. *A synthetic peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2 induces apoptosis in multiple myeloma and follicular lymphoma cells alone or in combination with agents targeting the BH3-binding pocket of Bcl-2*. Oncotarget. 2015 Sep 29;6(29):27388-402.
- 20 13. Monaco G, Decrock E, Akl H, Ponsaerts R, Vervliet T, Luyten T, De Maeyer M, Missiaen L, Distelhorst CW, De Smedt H, Parys JB, Leybaert L, Bultynck G. *Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl*. Cell Death Differ. 2012 Feb;19(2):295-309
- 25 14. Mikoshiba K. *IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts*. J Neurochem. 2007 Sep;102(5):1426-46. Review.
15. Yoshikawa F, Morita M, Monkawa T, Michikawa T, Furuichi T, and Mikoshiba K (1996) *Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*. J Biol Chem. 271, 18277–18284.

16. Xiaoying Chen, Jennica Zaro, and Wei-Chiang Shen. *Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Oct 15; 65(10): 1357–1369.

REVENDICATIONS

1. Inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand d'au moins l'un des récepteurs IP3R, pour son utilisation dans le traitement des cancers dont les cellules expriment la protéine Bcl-2 L10.
2. Inhibiteur pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 1 [RRETELLADY], les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.
3. Inhibiteur pour son utilisation selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend un domaine peptidique dont la séquence présente au moins 80 % d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO. 2 [MADPLRRETELLADYLGYCARE] ou SEQ ID NO. 3 [ADPLRRETELLADYLGYCARE], les résidus arginine et tyrosine soulignés étant conservés.
4. Inhibiteur pour son utilisation selon l'une des revendications 2 à 3, construit selon la structure suivante : [ADR]_x-[ESP]_y-[DOM]-[SADR]_z, où ADR est un composé d'adressage, ESP est un espaceur, DOM est le domaine peptidique défini en revendication 2 ou 3, SADR désigne un domaine peptidique d'adressage intracellulaire spécifique et où x, y et z sont égal à 0 ou 1, indépendamment entre eux.
5. Inhibiteur pour son utilisation selon la revendication 4, caractérisé en ce que les domaines ADR, ESP et SADR sont des domaines peptidiques.
6. Inhibiteur pour son utilisation selon la revendication 5, consistant en un peptide présentant la séquence peptidique représentée en SEQ ID NO. 4.
7. Inhibiteur compétitif de la liaison de la protéine Bcl-2 L10 sur le domaine de liaison au ligand d'au moins l'un des récepteurs IP3R, consistant en un peptide présentant la séquence peptidique représentée en SEQ ID NO. 4.

8. Inhibiteur pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, en combinaison avec au moins un produit de chimiothérapie.

9. Composition pharmaceutique comprenant, dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, au moins un inhibiteur selon la revendication 7.

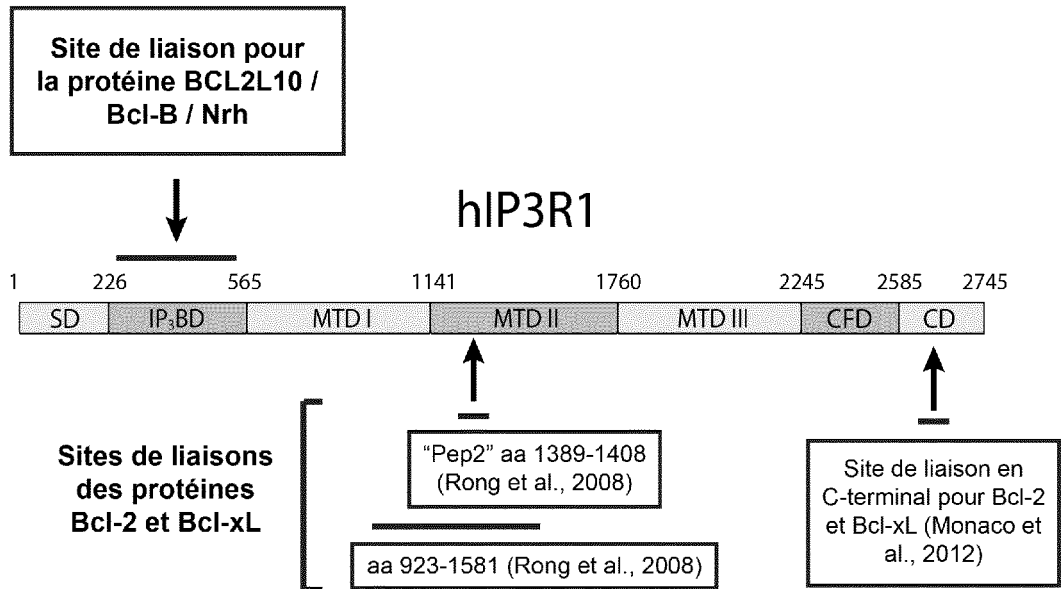


Figure 1

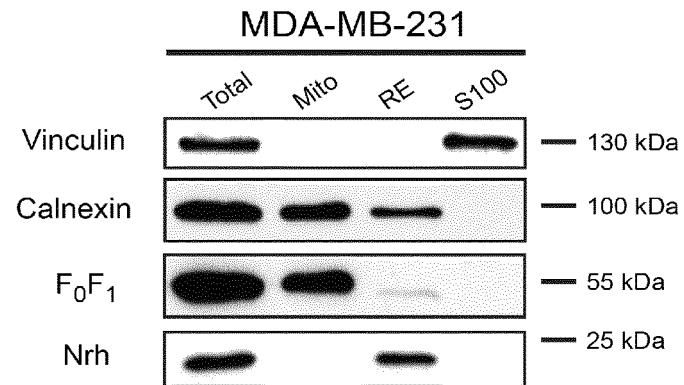


Figure 2

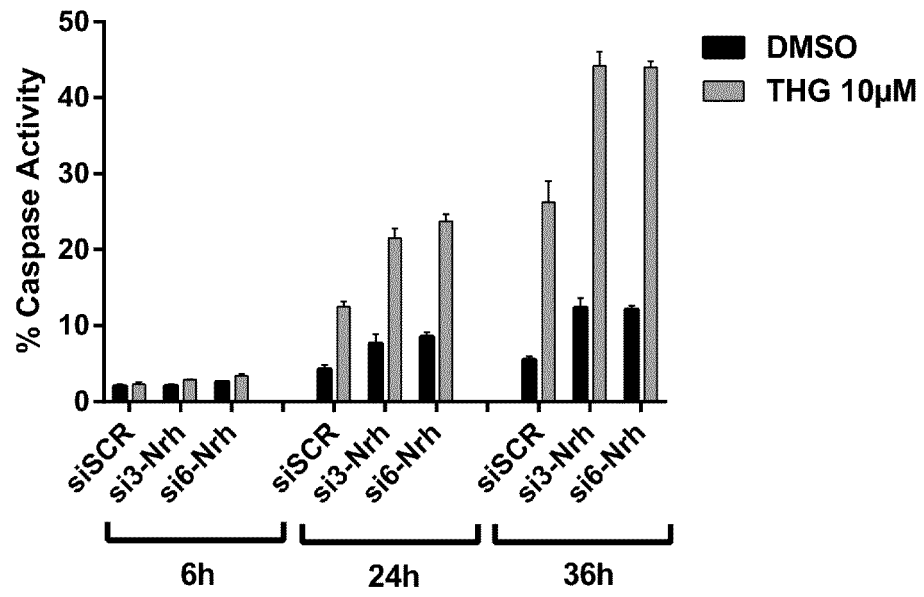
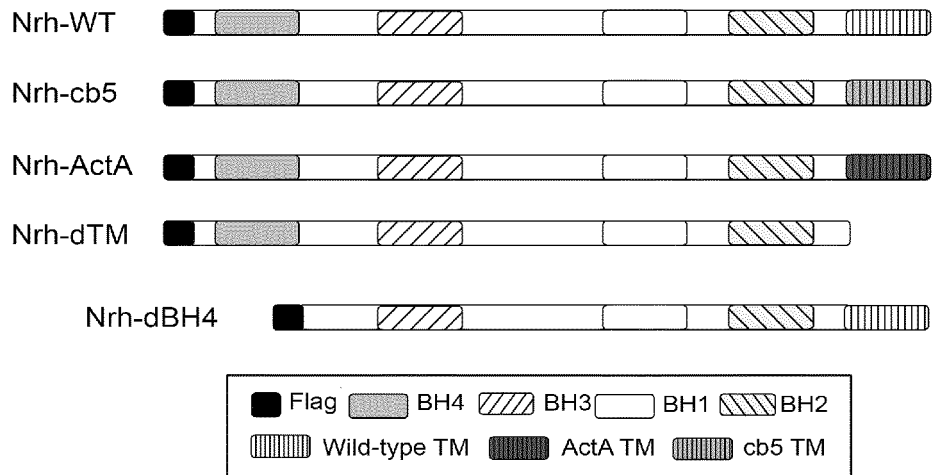


Figure 3

A



B

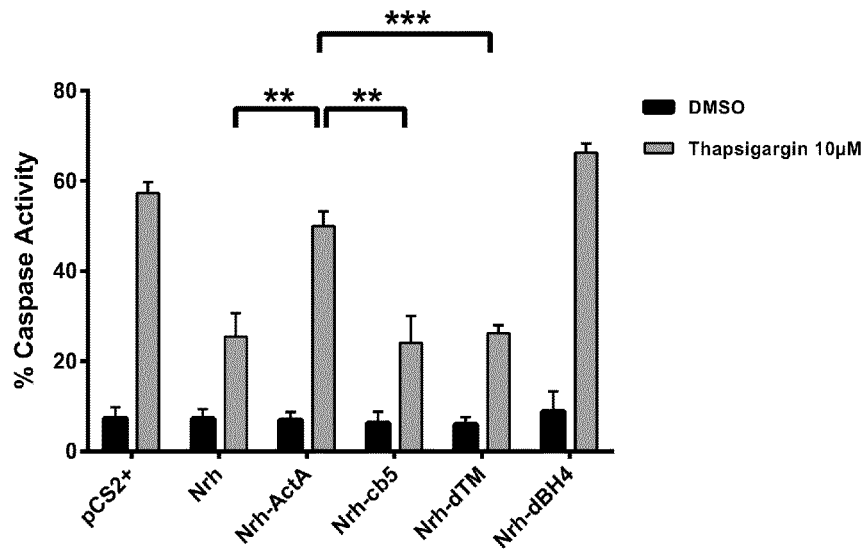


Figure 4

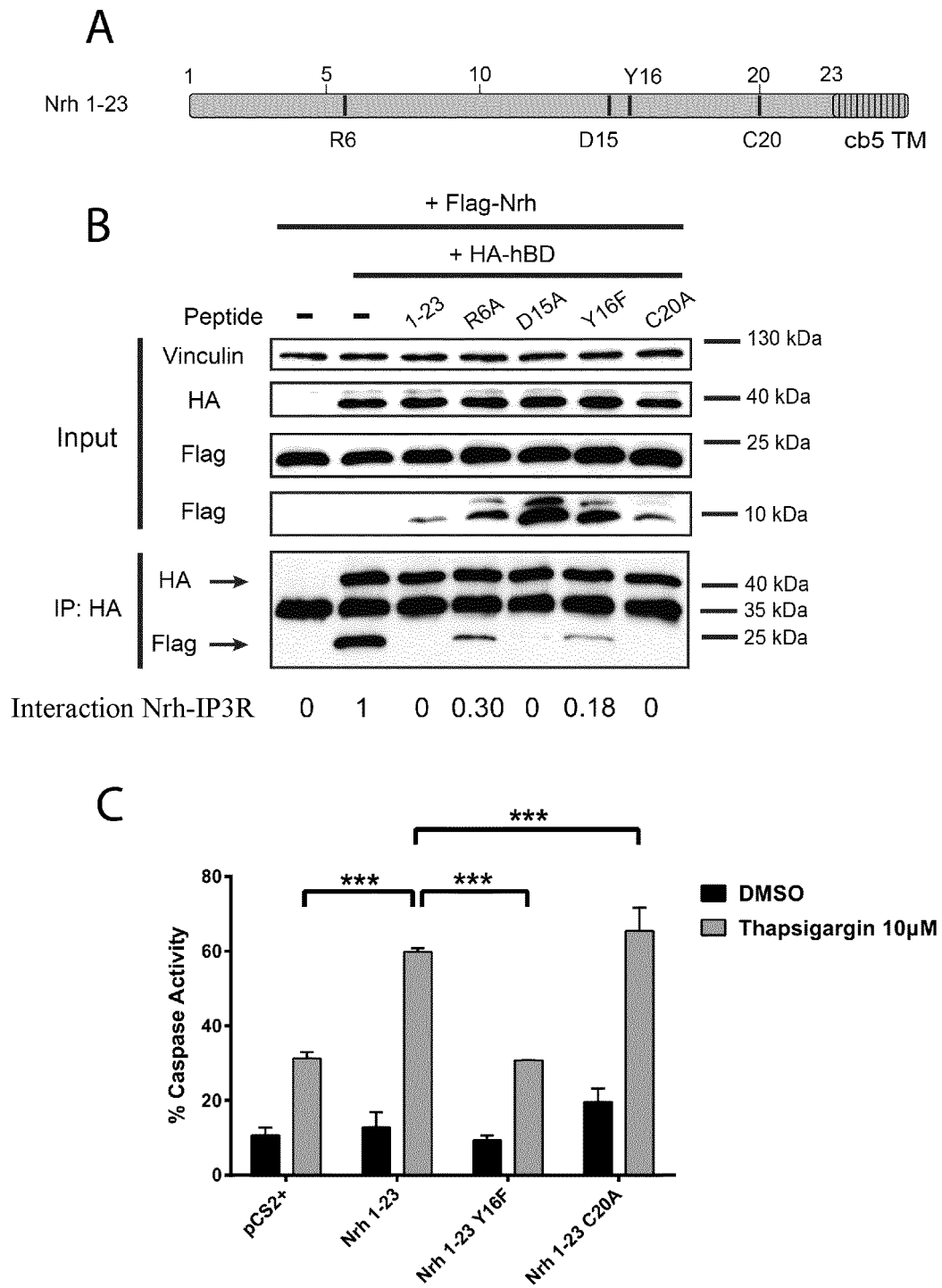


Figure 5

A

	TAT Sequence	Linker	Nrh 1-23
TAT Nrh 1-23	RKKRRQRRRGGSGGADPLRRETELL	LADY	LYGCARE
TAT Nrh 1-23 Y16F	RKKRRQRRRGGSGGADPLRRETELL	LAD	FLGCARE

B

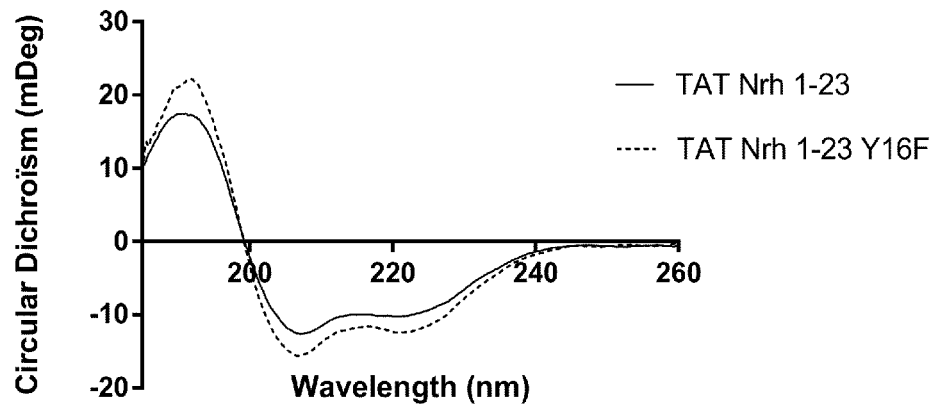


Figure 6

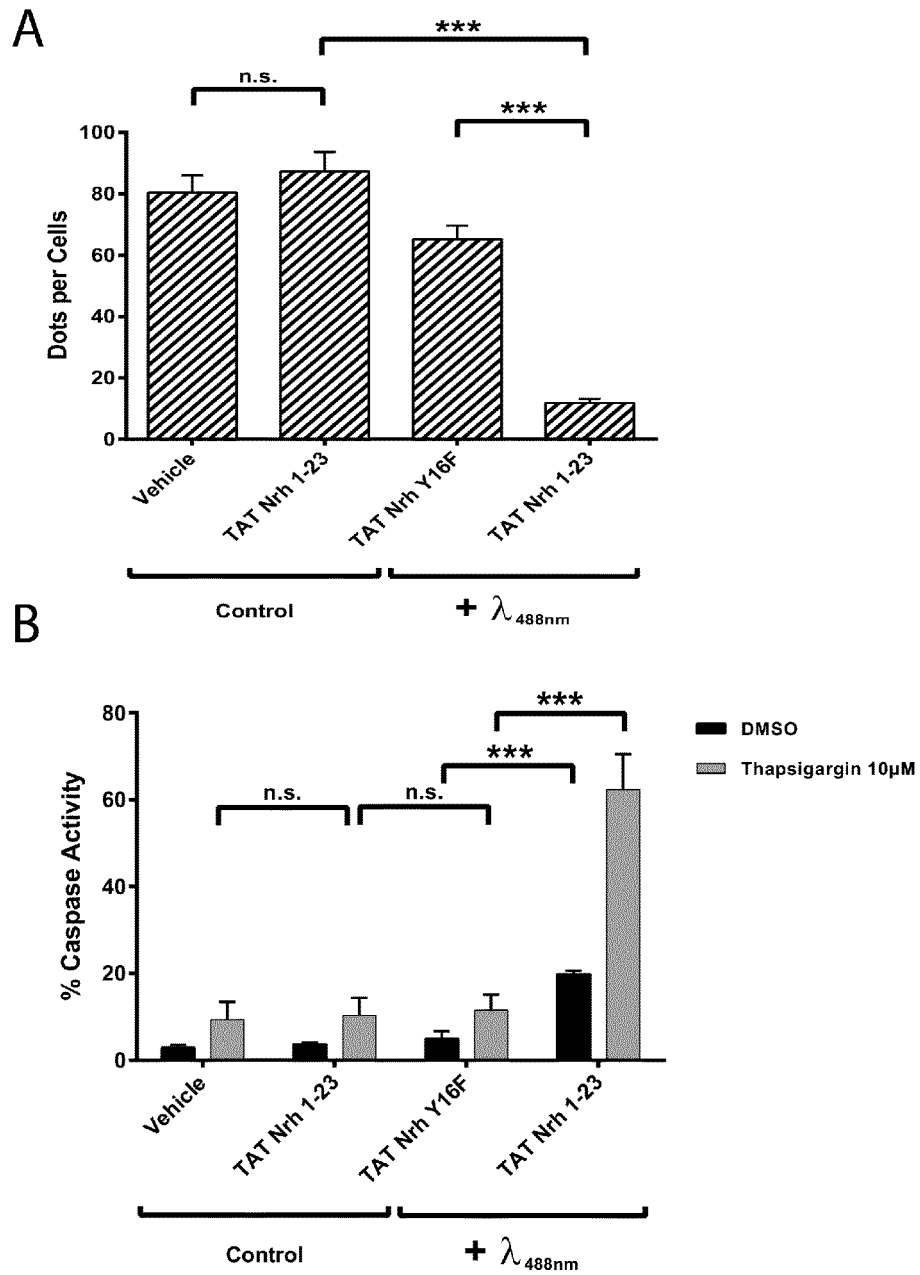


Figure 7

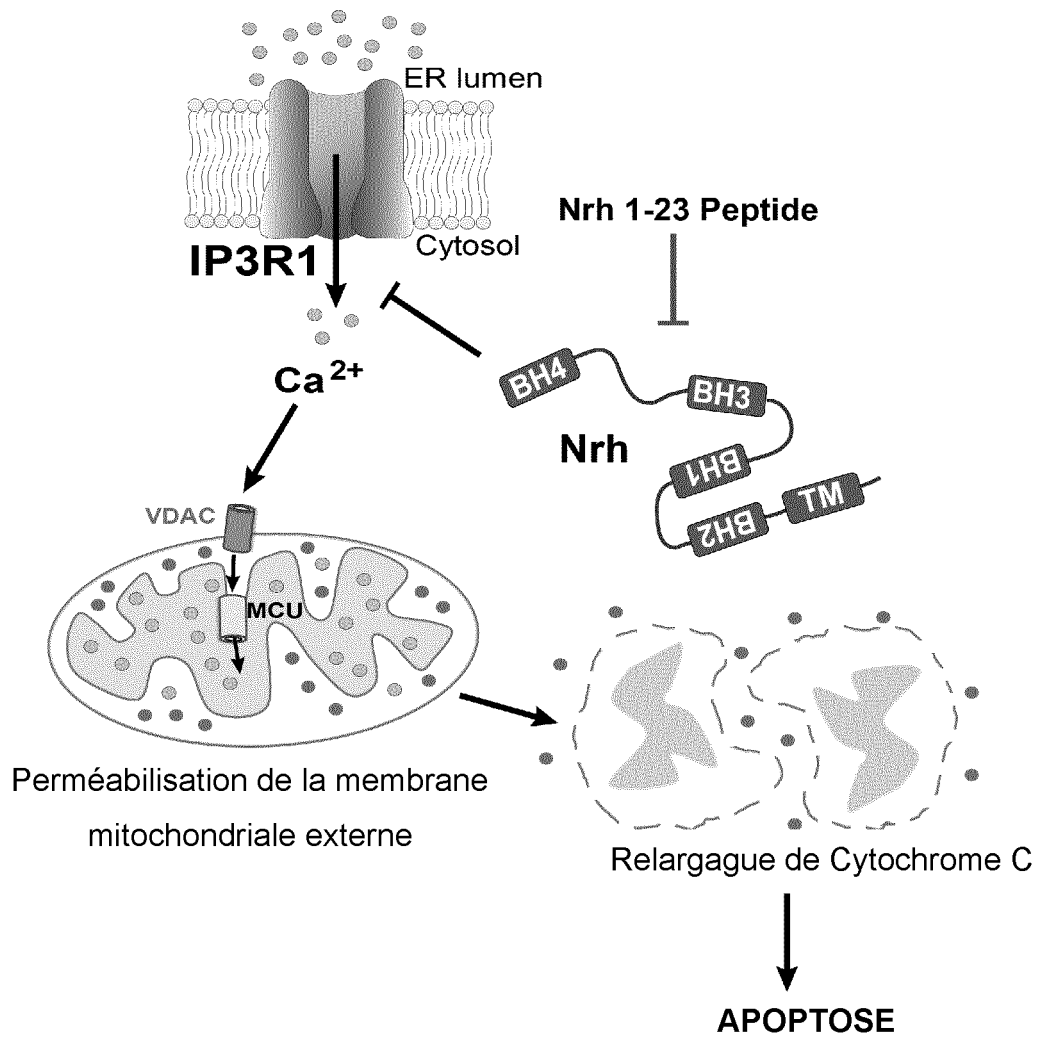


Figure 9

<223> Peptide R6A

<400> 5

Met Ala Asp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Glu Leu Leu Leu Ala Asp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gly Tyr Cys Ala Arg Glu
 20

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Y16F

<400> 6

Met Ala Asp Pro Leu Arg Glu Arg Thr Glu Leu Leu Leu Ala Asp Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Tyr Cys Ala Arg Glu
 20

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide D15A

<400> 7

Met Ala Asp Pro Leu Arg Glu Arg Thr Glu Leu Leu Leu Ala Ala Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gly Tyr Cys Ala Arg Glu
 20

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide C20A

<400> 8

Met Ala Asp Pro Leu Arg Glu Arg Thr Glu Leu Leu Leu Ala Asp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gly Tyr Ala Ala Arg Glu
 20

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Xaa is any amino acid

<400> 9

Arg Glu Arg Thr Glu Leu Leu Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

.<223> xaa is any amino acid

<400> 10

Arg Glu Arg Thr Xaa Xaa Leu Leu Ala Asp Tyr
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> xaa is any amino acid

<400> 11

Arg Glu Xaa Thr Glu Leu Leu Leu Ala Xaa Tyr
1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 12

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Penetratine

<400> 13

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Espaceur

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> cb5

<400> 15

Trp Trp Thr Asn Trp Val Ile Pro Ala Ile Ser Ala Val Ala Val Ala
1 5 10 15
Leu Met Tyr Arg Leu Tyr Met Ala Glu Asp
20 25

<210> 16

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Adressage RE

<400> 16
 Lys Asp Glu Leu
 1

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Adressage RE

<400> 17
 Lys Lys Met Pro
 1

<210> 18
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TAT-ESP-peptide-Cb5

<400> 18
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Glu Arg Thr Glu Leu Leu Ala Asp Tyr Leu Gly Tyr
 20 25 30
 Cys Ala Arg Glu Trp Trp Thr Asn Trp Val Ile Pro Ala Ile Ser Ala
 35 40 45
 Val Ala Val Ala Leu Met Tyr Arg Leu Tyr Met Ala Glu Asp
 50 55 60

<210> 19
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

<220>
 <223> Nrz

<400> 19
 Met Ser Cys Trp Leu Arg Glu Gln Thr Leu Leu Leu Ala Glu Asp Tyr
 1 5 10 15
 Ile Ser Phe Cys Ser Gly Ile Gln Gln Thr Pro
 20 25

<210> 20
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<220>
 <223> NR-13

<400> 20
 Met Pro Gly Ser Leu Lys Glu Glu Thr Ala Leu Leu Leu Glu Asp Tyr
 1 5 10 15
 Phe Gln His Arg Ala Gly Gly Ala Ala Leu Pro
 20 25

<210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21
 Met Ala Asp Ser Gln Asp Pro Leu His Glu Arg Thr Arg Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Asp Tyr Ile Phe Phe Cys Ala Arg Glu Pro Asp Thr Pro
 20 25 30

<210> 22
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> BCL2 L10

<400> 22
 Met Ala Asp Pro Leu Arg Glu Arg Thr Glu Leu Leu Leu Ala Asp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gly Tyr Cys Ala Arg Glu Pro Gly Thr Pro
 20 25

<210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> BCL2

<400> 23
 Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1 5 10 15
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu
 20 25

<210> 24
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> BCL XL

<400> 24
 Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser
 20

<210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> BCL A1

<400> 25
 Met Thr Asp Cys Glu Phe Gly Tyr Ile Tyr Arg Leu Ala Gln Asp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gln Cys Val Leu Gln Ile Pro Gln Pro Gly
 20 25

<210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> BCL W

<400> 26

Met	Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Asp
1				5				10						15	
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Leu	Arg	Gln	Lys	Gly	Tyr					
			20					25							

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

DATABASE Geneseq [Online] 27 janvier 2003 (2003-01-27), "Human Bcl-B protein BH4 domain #2.", XP002763279, extrait de EBI accession no. GSP:AAE29102 Database accession no. AAE29102 -& WO 02/072601 A2 (BURNHAM INST [US]; REED JOHN C [US]; KE NING [US]; GODZIK ADAM [US]) 19 septembre 2002 (2002-09-19)

DATABASE Geneseq [Online] 6 novembre 2014 (2014-11-06), "B-cell lymphoma B protein fragment (BCL-B), SEQ 140.", XP002763280, extrait de EBI accession no. GSP:BBN93125 Database accession no. BBN93125 & WO 2014/144768 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 18 septembre 2014 (2014-09-18)

BONNEAU BENJAMIN ET AL: "The Bcl-2 Homolog Nrz Inhibits Binding of IP3 to Its Receptor to Control Calcium Signaling During Zebrafish Epiboly", SCIENCE SIGNALING, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 7, no. 312 ra14, 1 février 2014 (2014-02-01), pages 1-11, XP009192163, ISSN: 1945-0877, DOI: 10.1126/SCISIGNAL.2004480

POPGEORGIEV NIKOLAY ET AL: "The Apoptotic Regulator Nrz Controls Cytoskeletal Dynamics via the Regulation of Ca²⁺ Trafficking in the Zebrafish Blastula", DEVELOPMENTAL CELL, vol. 20, no. 5, mai 2011 (2011-05), pages 663-676, XP002763281, ISSN: 1534-5807

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

ZHANG H ET AL: "Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway", HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 10, no. 21, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 2329-2339, XP002972060, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/HMG/10.21.2329

WO 2013/128089 A1 (UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS [FR]; CT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NICE) 6 septembre 2013 (2013-09-06)

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT