

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 30.12.99.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 06.07.01 Bulletin 01/27.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : AVENTIS PHARMA S.A. Société ano-
nyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : ABITBOL MARC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ UTILISATION D'UN VECTEUR COMPRENANT UN ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR UN FACTEUR ANTI-
ANGIOGENIQUE POUR LE TRAITEMENT DES NEOVASCULARISATIONS CORNEENNES.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'un vec-
teur comprenant un acide nucléique codant pour un facteur
anti-angiogénique pour la prévention, l'amélioration et/ ou le
traitement des néovascularisations cornéennes.



UTILISATION D'UN VECTEUR COMPRENANT UN ACIDE
NUCLEIQUE CODANT POUR UN FACTEUR ANTI-ANGIOGENIQUE POUR
LE TRAITEMENT DES NEOVASCULARISATIONS CORNEENNES

5 La présente invention concerne l'utilisation d'un vecteur comprenant un acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations de la cornée. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques et un dispositif permettant l'administration locale et efficace de ce vecteur.

10 Les kératopathies sont des pathologies de la cornée d'origine traumatique, chimique, infectieuse ou génétique. Les plus fréquentes sont d'origines infectieuses virales telles les kératopathies herpétiques ou zostériennes (zona ophtalmique, kératiques neuroparalytique). Les kératopathies traumatiques sont provoquées par des projections de petits objets tels les bris de pare-brise lors d'accidents de la circulation, et les kératopathies chimiques peuvent être dues à la projections de substances
15 chimiques sur le globe oculaire.

L'ensemble de ces pathologies se complique souvent de néovascularisations qui sont en grande partie responsables de l'opacification de la cornée conduisant à la cécité. Le seul traitement actuellement disponible pour rendre la vue au patient atteint de kératopathie cécitante compliquée de néovascularisation est la greffe de cornée.
20 Bien qu'efficace, cette approche est toutefois considérablement limitée par le manque de greffons : ainsi on observe en France un déficit annuel de 3000 greffons. Ce point illustre le besoin pour de nouveaux traitements des kératopathies cécitantes.

L'œil est constitué d'un segment antérieur qui comprend la cornée, la chambre antérieure remplie d'humeur aqueuse, l'iris et le cristallin, et d'un segment postérieur dont font partie la rétine, la choroïde et la partie postérieure de la sclérotique. La
25 cornée comprend, de la surface vers la profondeur de l'œil, l'épithélium cornéen, la membrane basale de Bowman, le stroma cornéen et la membrane de Descemet sur laquelle repose l'endothélium cornéen. La cornée, enveloppe fibreuse et transparente, ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique. Elle est nourrie par diffusion des métabolites à partir de l'humeur aqueuse et des vaisseaux sanguins du limbe (jonction scléro-cornéenne), et reçoit une partie de l'O₂ directement à partir de l'environnement
30 extérieur.

Le réseau sanguin de l'œil dérive de l'artère ophtalmique par deux systèmes séparés, les vaisseaux rétiens et le système vasculaire uvéal qui comprend les réseaux vasculaires de l'iris, du corps ciliaire et de la choroïde. Cet arbre vasculaire peut être modifié dans des circonstances pathologiques, caractérisées par une diminution du flux sanguin ou de la quantité d'oxygène. Des néovaisseaux prennent alors naissance à partir de petites boucles vasculaires issues de veinules, en bordure des zones d'ischémie. La membrane basale de ces veinules se fragmente sous l'effet d'enzymes protéolytiques et permet ainsi une migration des cellules endothéliales. Celles-ci changent de morphologie, se multiplient puis se creusent de vacuoles qui vont progressivement confluer et s'organiser pour former de véritables lumières vasculaires. La mauvaise étanchéité des jonctions interendothéliales et l'interruption de la membrane basale de ces néovaisseaux augmente leur perméabilité et entraîne une extravasation d'hématies.

Cette néovascularisation ou angiogénèse, est ainsi à l'origine de la plupart des maladies visuelles qui provoquent une baisse de l'acuité visuelle, voire la cécité. La prolifération des vaisseaux limniques dans les couches superficielles de la cornée apparaît, dans de nombreux états pathologiques tels que certaines kératoconjunctivites virales, notamment celles causées par le virus de l'herpès, et les oedèmes.

Les inventeurs ont mis au point une méthode particulièrement efficace de traitement des néovascularisations cornéennes consistant dans l'administration au niveau de l'oeil d'une composition pharmaceutique comprenant un vecteur codant pour un facteur anti-angiogénique combinée à l'application d'une lentille de contact souple sur la cornée. La lentille de contact peut être appliquée préalablement, de manière concomitante ou postérieurement à l'administration de la composition comprenant le vecteur. De manière préférée, l'administration de la composition contenant le vecteur est concomitante à l'application de la lentille de contact et de préférence encore, l'administration se fait par imprégnation préalable de la lentille de contact avec la composition comprenant ledit vecteur avant l'application de ladite lentille sur la cornée.

La composition pharmaceutique comprenant le vecteur peut être sous toute forme adaptée à un usage oculaire et notamment sous la forme de collyre ou de pommade ophtalmique. De manière préférée; la composition pharmaceutique se présente sous forme de collyre.

Pour étudier l'effet des facteurs anti-angiogéniques dans la prévention et le traitement des pathologies oculaires liées à la néovascularisation, la demanderesse a utilisé deux modèle animaux de rats présentant des néovascularisations cornéennes. Le transfert d'acides nucléiques codant pour des facteurs anti-angiogéniques a été réalisé
5 au moyen d'adénovirus recombinants défectifs codant pour différents facteurs anti-angiogéniques administrés par instillation oculaire ou par application de lentilles souples préalablement imbibées de solution contenant des adénovirus. De manière inattendue, la demanderesse a mis en évidence que le transfert d'un vecteur comprenant un acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique au niveau de
10 la cornée au moyen d'une lentille de contact préalablement imprégnée d'une solution comprenant ledit vecteur permet de prévenir et de traiter les néovascularisations cornéennes avec une efficacité jamais égalée jusqu'alors.

Parmi les différents facteurs anti-angiogéniques utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer notamment : le fragment N-terminal de l'activateur du plasminogène uPA (ATF) (Appella et al. J. Biol. Chem. 262, 4437-4440 (1987),
15 l'angiostatine (M. O'Reilly *et al.* Cell 79, 1157-1164 (1994)), et en particulier l'angiostatine K3 (fragment N-terminal 1-333 du plasminogène humain), l'endostatine (M. O'Reilly *et al.* Cell 88, 277-285 (1997), le fragment 16 kDa de la prolactine (C. Clapp *et al.* Endocrinol. 133, 1292-1299 (1993)) ou le facteur plaquettaire 4 PF-4
20 (S.K. Gupta *et al.* P.N.A.S. USA 92, 7799-7803 (1995)).

Un premier objet de l'invention concerne l'utilisation d'un vecteur comprenant un acide nucléique codant pour au moins un facteur anti-angiogénique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée par imprégnation d'une lentille souple et application de ladite lentille sur la cornée pour la
25 prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations cornéennes.

Préférentiellement, l'acide nucléique codant pour le facteur anti-angiogénique est un acide nucléique codant pour un polypeptide choisi parmi le fragment N-terminal de l'activateur du plasminogène uPA (ATF), l'angiostatine, l'angiostatine K3, l'endostatine, le fragment 16 kDa de la prolactine ou le facteur plaquettaire 4 (PF-4)
30 ou une combinaison d'acides nucléiques codant pour au moins deux de ces facteurs. De manière préférée encore, le facteur anti-angiogénique est choisi parmi le fragment N-terminal de l'activateur du plasminogène uPA (ATF) et l'angiostatine K3.

Selon un mode particulier, le facteur anti-angiogénique est un variant des facteurs précédemment cités. Au sens de la présente invention on entend par "variant" d'un polypeptide ou d'une protéine tout analogue, fragment, dérivé ou forme mutée qui est dérivé d'un polypeptide ou d'une protéine et qui retient la fonction anti-angiogénique dudit polypeptide ou de ladite protéine. Différents variants d'un polypeptide ou d'une protéine peuvent exister à l'état naturel. Ces variants peuvent être des variations alléliques caractérisées par des différences dans la séquence nucléotidique des gènes de structure codant pour la protéine ou peuvent résulter d'un épissage différentiel ou de modifications post-traductionnelles. Ces variants peuvent être obtenus par substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus acides aminés. Ces modifications peuvent être réalisées par toutes techniques connues de l'homme du métier.

Ces variants sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

D'autres variants utilisables dans le cadre de l'invention sont notamment les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

La séquence d'ADN codant pour le facteur anti-angiogénique utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut s'agir d'un acide nucléique d'origine animale ou humaine, de préférence il s'agit d'un acide nucléique d'origine humaine. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Avantageusement, la séquence codant pour le facteur anti-angiogénique est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules de l'épithélium cornéen. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du

5 facteur anti-angiogénique. 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

10 l'adénovirus 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 de la cornée, de

15 manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le vecteur a effectivement infecté ces cellules.

L'acide nucléique codant pour un ou plusieurs facteurs anti-angiogéniques est introduit dans un vecteur. Au sens de la présente invention on entend par "vecteur" tout moyen permettant le transfert d'un acide nucléique dans une cellule hôte, de

20 préférence au niveau des tissus de l'oeil et plus particulièrement au niveau de la cornée. Le terme vecteur comprend les vecteurs viraux et non-viraux pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule *in vivo* ou *ex vivo*. Un type de vecteur pour la mise en oeuvre de l'invention peut être par exemple un plasmide, un cosmide ou tout ADN non encapsidé par un virus, un phage, un chromosome artificiel, un virus

25 recombinant, etc. Il s'agit de préférence d'un plasmide ou d'un virus recombinant.

Parmi les vecteurs de type plasmidique, on peut citer tous les plasmides de clonage et/ou d'expression connus de l'homme du métier et qui comportent généralement une origine de répllication. On peut citer également des plasmides portant des origines de répllication et/ou des marqueurs de sélection perfectionnés tels que

30 décrits par exemple dans les demandes WO96/26270 et WO97/10343.

Parmi les vecteurs de type virus recombinant, on peut citer préférentiellement les virus adénovirus, rétrovirus, virus de l'herpès, les lentivirus, les virus adéno-associés recombinants ou le virus SV40. La construction de ce type de virus

- recombinants défectifs pour la réplication a été largement décrite dans la littérature, ainsi que les propriétés d'infection de ces vecteurs (voir notamment S. Baeck et K.L. March (1998), *Circul. Research* vol. 82, pp 295-305), T. Shenk, B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al (1996), *Adenoviridae : the viruses and their replication (in virology)*. Pp 211-2148, EDS - Ravenspublishers/Philadelphia, P. Yeh et M. Perricaudet (1997), *FASEB Vol. 11*, pp 615-623.

Un virus recombinant particulièrement préféré pour la mise en œuvre de l'invention est un adénovirus recombinant défectif.

- Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 (kilobases) kb environ. Il en existe différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C, en particulier les adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) ou 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

- Le génome des adénovirus comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

- Pour leur utilisation comme vecteurs recombinants, différentes constructions dérivées des adénovirus ont été préparées, incorporant différents gènes thérapeutiques. Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de réplication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la réplication

virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de 72kDa de liaison à l'ADN (DBP) (Van der Vliet et al., J. Virol., 1975, 15(2) 348-354). D'autres vecteurs comprennent une délétion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits par exemple dans les demandes WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378). En outre, des vecteurs portant une modification au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Avantageusement, l'adénovirus recombinant utilisé dans le cadre de l'invention comprend une délétion dans la région E1 de son génome. Encore plus particulièrement, il comprend une délétion des régions E1a et E1b. A titre d'exemple, on peut citer des délétions affectant les nucléotides 454-3328; 386-3446 ou 357-4020 (par référence au génome de l'Ad5).

Selon une autre variante, l'adénovirus recombinant utilisé dans le cadre de l'invention comprend en outre une délétion dans la région E4 de son génome. Plus particulièrement, la délétion dans la région E4 affecte l'ensemble des phases ouvertes. On peut citer à titre d'exemple précis les délétions 33466-35535 ou 33093-35535. D'autres types de délétions dans la région E4 sont décrites dans les demandes WO95/02697 et WO96/22378, incorporées à la présente par référence.

La cassette d'expression contenant l'acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique peut être insérée en différents sites du génome recombinant. Elle peut être insérée au niveau de la région E1, E3 ou E4, en remplacement des séquences

délétées ou en surplus. Elle peut également être insérée en tout autre site, en dehors des séquences nécessaires en cis à la production des virus (séquences ITR et séquence d'encapsidation).

5 Au sens de la présente invention on entend par "cassette d'expression" d'un
acide nucléique, un fragment d'ADN qui peut être inséré dans un vecteur à des sites de
restrictions spécifiques ; le fragment d'ADN comprend, outre la séquence
nucléotidique codant pour un ARN ou un polypeptide d'intérêt, les séquences
nécessaires à l'expression (enhanceur(s) , promoteur(s), séquence de polyadénylation
...) de ladite séquence d'intérêt. Le fragment d'ADN et les sites de restriction sont
10 conçus pour assurer une insertion dudit fragment dans un cadre de lecture approprié
pour la transcription et/ou la traduction.

Les adénovirus recombinants sont produits dans une lignée d'encapsidation,
c'est-à-dire une lignée de cellules capables de compléter en trans une ou plusieurs
des fonctions déficientes dans le génome adénoviral recombinant. Parmi les lignées
15 d'encapsidation connues par l'homme du métier, on peut citer par exemple la lignée
293 dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus
précisément, la lignée 293 est une lignée de cellules embryonnaires humaines de rein
contenant l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5
(Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a
20 et E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la
protéine pIVa2. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus
recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la
région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cette lignée est
également capable de produire, à température permissive (32°C), des stocks de virus
25 comportant en outre la mutation E2 thermosensible. D'autres lignées cellulaires
capables de compléter la région E1 ont été décrites, basées notamment sur des
cellules de carcinome de poumon humain A549 (WO94/28152) ou sur des
rétinoblastes humains (Hum. Gen. Ther. (1996) 215). Par ailleurs, des lignées capables
de trans-complémenter plusieurs fonctions de l'adénovirus ont également été décrites.
30 En particulier, on peut citer des lignées complétant les régions E1 et E4 (Yeh et
al., J. Virol. Vol. 70 (1996) pp 559-565; Cancer Gen. Ther. 2 (1995) 322 ; Krougliak
et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575) et des lignées complétant les régions E1 et
E2 (WO94/28152, WO95/02697, WO95/27071).

Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsidation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Pour la mise en oeuvre du procédé, l'ADN viral introduit peut être le génome viral recombinant complet, éventuellement construit dans une bactérie (WO96/25506) ou dans une levure (WO95/03400), transfecté dans les cellules. Il peut également s'agir d'un virus recombinant utilisé pour infecter la lignée d'encapsidation. L'ADN viral peut aussi être introduit sous forme de fragments portant chacun une partie du génome viral recombinant et une zone d'homologie permettant, après introduction dans la cellule d'encapsidation, de reconstituer le génome viral recombinant par recombinaison homologue entre les différents fragments.

Après la lyse des cellules, les particules virales recombinantes sont isolées par centrifugation en gradient de chlorure de césium. Une méthode alternative a été décrite dans la demande WO98/00528 incorporée à la présente par référence.

A titre d'exemple de vecteur convenant pour la mise en oeuvre de la présente invention on peut citer notamment : l'adénovirus recombinant défectif comprenant le gène codant pour le fragment ATF (Ad.CMV.ATF) tel que décrit dans la demande WO98/49321 incorporée à la présente par référence, l'adénovirus recombinant défectif comprenant le gène codant l'angiostatine K3 (Ad-K3) tel que décrit dans la demande WO98/49321.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un vecteur tel que décrit ci-avant et un véhicule physiologiquement acceptable pour une formulation destinée à être administrée dans l'oeil, en particulier par instillation. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés destinés à une instillation oculaire..

Les doses utilisées pour l'instillation ou l'impregnation des lentilles de contact peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la nature chimique des lentilles de contact, du gène à exprimer, ou encore de la durée de l'expression recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de

doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution virale, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

En outre, les compositions selon l'invention peuvent également comprendre un agent de transfert chimique ou biochimique. On entend par le terme "agent de transfert chimique ou biochimique" tout composé (i.e., autre qu'un virus recombinant) facilitant la pénétration d'un acide nucléique dans une cellule. Il peut s'agir d'agents non viraux cationiques comme des lipides cationiques, des peptides, des polymères (Polyéthylène Imine, Polylysine), des nanoparticules ; ou d'agents non viraux non cationiques comme des liposomes non cationiques, des polymères ou des nanoparticules non cationiques.

Selon un mode préféré, les compositions selon l'invention comprennent un vecteur recombinant défectif comprenant un gène codant pour un facteur anti-angiogénique et sont formulées pour une instillation intraoculaire. Avantageusement, les compositions de l'invention comprennent de 10^4 à 10^{14} pfu, et de préférence de 10^6 à 10^{10} pfu. Le titre des solutions utilisées pour l'imprégnation des lentilles de contact est compris entre $1 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^{12}$ pfu / ml et de préférence entre $1 \cdot 10^8$ et $1 \cdot 10^{10}$ pfu / ml.

L'invention concerne également un kit comprenant un récipient contenant une composition telle que précitée et au moins une lentille de contact et l'utilisation du kit pour la préparation d'un médicament destiné à être administré par imprégnation d'une lentille pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations cornéennes.

Les lentilles de contact utilisable dans le cadre de la présente invention sont bien connues de l'homme du métier et sont de préférence des lentilles de contact souples, telles que décrites notamment dans Künzler *et al.* (*Chemistry & Industry*, 651-655 (1995) ; Künzler *et al.* (TRIP, Vol 4 (2) 52-59 (1996) ; J. Singh *et al.* (*J.M.S. Rev. Macromol. Chem. Phys.* C32(3&4), 521-534 (1992)) ; J.C. Wheeler *et al.* (*Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 6 (3&4) : 207-217 (1996)).

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un médicament utile pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations

cornéennes caractérisé en ce que l'on mélange un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique avec un ou plusieurs adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

- 5 L'invention concerne également une méthode de traitement d'un mammifère, et notamment de l'homme, présentant une néovascularisation cornéenne comprenant l'administration d'une quantité efficace d'un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique par imprégnation d'une lentille de contact.

- 10 La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1 : Révélation de l'expression de la β -galactosidase par immunohistochimie sur coupe de cornée de rat adulte, incluse dans de la paraffine (5 μ m) et ayant été en contact avec une lentille imprégnée d'Ad. β -gal $2 \cdot 10^7$ pfu), durant 72 h. Coloration à l'Hémalun. (A) Cornée néovascularisée suite à un grattage superficiel, grossissement x 265. (B) marquage nucléaire de cellules épithéliales révélées avec un anticorps anti β -gal, grossissement x 1310. (C) Cornée témoin normale avasculaire, grossissement x 525. (e : épithélium ; en: endothélium ; néovx : néovaisseaux ; s : stroma).
- 15

- 20 Figure 2 : photographie d'une néovascularisation cornéenne (triangle noir) induite par sutures (flèches noires) placées dans la cornée d'un rat adulte deux semaines plus tôt. Grossissement x 24.

- Figure 3 : Effet anti-angiogénique préventif d'une lentille imprégnée d'une solution adénovirale (Ad.CMV.ATF, figure (B) et (D) ; AdK3 , figure (A) et (C)). Grossissement x 20. (A) et (B) correspondent à des cornées qui sont restées en contact de la lentille pendant une semaine. (C) et (D) correspondent à des cornées qui sont restées en contact de la lentille pendant deux semaines.
- 25

MATERIEL ET METHODES

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
5 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
10 Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987.

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
15 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
20 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.

25 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.

Modèle de néovascularisation cornéenne chez le rat

- 5 Trente rats Wistar mâles adultes, de 150 g, sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de 15 mg de Kétamine et 1.5 mg de Xylazine. L'anesthésie générale est complétée par une anesthésie topique à l'aide d'une goutte de chlorhydrate d'oxybuprocaine (Novésine®) au niveau cornéen. Deux modèles ont été testés : un modèle par suture interrompues et un modèle par grattage.
- 10 Modèle par sutures interrompues : vingt rats sont utilisés pour évaluer ce mode d'induction de néovascularisation cornéenne. Trois sutures interrompues (Nylon 8-0, aiguille 50 µm) sont placées à travers la cornée centrale de l'œil droit de l'animal dans des conditions aseptiques, en utilisant un microscope opératoire (Zeiss). L'œil gauche non opéré sert de témoin. Les cornées sont suivies avec un biomicroscope
- 15 photographique pour le développement des néovaisseaux cornéens. Pour quantifier la néovascularisation cornéenne, en double aveugle, l'œil est divisé en quatre quadrants cornéens identiques et la néovascularisation de chacun est graduée de 0 à 3, par tranches de 0.5. Ainsi, le score pour chaque œil s'étale de 0 à 12 (W. Streilen et al. 1996, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37 : 413-424).
- 20 Modèle par grattage : les épithéliums cornéen et limbique de l'œil droit de dix rats sont retirés par grattage chirurgical pendant 10 min. à l'aide d'un scalpel 15°, puis par débridement à l'éthanol (EtOH) 100° sous un microscope opératoire (Zeiss), (A. HUANG *et al.* 1988, Ophthalmology 95, 228-235). Les cornées dénudées cicatrisent en une dizaine de jours et se vascularisent. La néovascularisation cornéenne est ensuite
- 25 évaluée comme décrit dans le modèle par sutures interrompues, l'œil gauche non opéré servant de témoin.
- 30 Préparation et pose des lentilles : des lentilles souples jetables sont taillées avec un emporte-pièce d'un diamètre inférieur à celui de la cornée du rat (3 mm) puis sont mises en présence, pendant une à deux heure(s) à température ambiante, des solutions adénovirales AdK3, Ad.CMV.ATF ou Ad.CMVβgal, respectivement de 4.5×10^5 pfu (plaque forming unit), 10^6 pfu et 2×10^7 pfu pour chaque lentille. Des lentilles témoins sont également réalisées avec du glycérol à 10%, véhicule dans lequel chaque

adénovirus est dilué. Une fois la lentille mise en place sur la cornée droite du rat, l'oeil est soigneusement refermé en pratiquant une tarsorrhaphie (soie 6-0, aiguille 50 μ m), l'œil gauche non opéré servant de témoin.

- L'expression du transgène par les adénovirus est détectée grâce aux techniques
- 5 (1) de révélation par colorimétrie sur coupes congelées, pour la révélation de la β -galactosidase uniquement, ou (2) d'immunohistochimie sur coupes paraffine.

- (1) Des rats Wistar nouveaux-nés reçoivent une lentille d'Ad.CMV β gal sur l'œil droit. Pour cela, les animaux sont anesthésiés par immersion dans la glace puis la paupière est soigneusement coupée parallèlement à sa future ligne d'ouverture, à l'aide
- 10 de ciseaux de Dowell coudés à 45° et d'une pince microchirurgicale. Une fois la lentille placée sur la cornée, l'œil est refermé à l'aide de soie 6.0.

- (2) Douze rats adultes sans néovascularisation cornéenne (quatre animaux par lot) reçoivent une lentille soit d'AdK3, soit d'Ad.CMV.ATF ou d'Ad.CMV β gal sur l'œil droit, et 3 rats avec néovascularisation sont opérés avec une lentille
- 15 d'Ad.CMV β gal. Une tarsorrhaphie est réalisée pour refermer l'œil opéré.

- Techniques de révélation : trois techniques différentes sont utilisées pour détecter la β -galactosidase. Les animaux sont sacrifiés par élévation cervicale 72 h après la pose de la lentille, les paupières sont ouvertes et les yeux énucléés à la pince. La β -galactosidase est détectée sur oeil entier ou sur des coupes congelées de 14 μ m
- 20 ou sur des coupes paraffine de 5 μ m d'épaisseur.

- (i) Sur oeil entier : après fixation dans du glutaraldéhyde 0.5 % pendant 1 h à température ambiante, chaque œil (de rat adulte ou nouveau-né) est plongé dans une solution de PBS 1X contenant 2 mM de $MgCl_2$ puis est débarrassé des tissus musculaires résiduels sous loupe binoculaire (Leica). Chaque œil est alors incubé dans
- 25 une solution de révélation de 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactoside (X-gal) pendant 2 h, à 37°C. Après plusieurs lavages dans du PBS 1x, l'œil est photographié sous loupe binoculaire.

- (ii) Coupes congelées de 14 μ m : les yeux de rat nouveau-né sont immédiatement fixés dans du glutaraldéhyde 0.5 % pendant 1 h à température
- 30 ambiante puis sont cryoprotégés dans du sucrose 15 % pendant 30 min. Les yeux sont ensuite déposés dans des cupules en plastique solide contenant un milieu d'inclusion

(Tissue Tek) qui, une fois congelé dans de l'isopentane à -30°C , permet de conserver les tissus à -80°C . Les yeux sont coupés à $14\text{ }\mu\text{m}$ au cryostat (Leica). La solution de révélation est ensuite déposée directement sur les coupes, en chambre humide, pendant 2 h à 37°C . Après trois rinçages de 10 min. en PBS 1x, les coupes sont contre-

5 colorées au rouge neutre 1 %, déshydratées dans des bains de degré d'alcool croissant : 80° , 95° et 100° puis montées entre lame et lamelle dans de l'eukitt.

(iii) Coupes paraffine de $5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur : la méthode de détection de la β -galactosidase par immunohistochimie est une technique beaucoup plus sensible que la méthode de révélation classique par colorimétrie. Après 48 heures d'immersion dans

10 le fixateur de Davidson, les yeux de rat adulte sont disséqués soigneusement afin de retirer le cristallin, disposés dans une cassette plastique et placés dans le panier d'un automate qui réalise le cycle de traitement suivant : Formol 10%, 30 min. ; EtOH 70° , 1 h ; EtOH 80° , 1 h ; EtOH 100° , 5 fois 1 h ; xylène, 2 fois 1h30 ; paraffine, 4 fois 1 h. Les globes sont ensuite inclus dans la paraffine et coupés en sections de $5\text{ }\mu\text{m}$ grâce au

15 microtome (Leica), de façon sagittale, parallèlement au nerf optique. Les coupes sont recueillies sur des lames pré-traitées (DAKO).

Fixation des coupes : pour bénéficier d'une révélation immunohistochimique, avec un anticorps anti β -galactosidase (TEBU), les lames sont séchées en étuve à 56°C pendant 48 h puis déparaffinées dans 2 bains de xylène de 15 min. et 2 bains

20 d'EtOH 100° de 10 min. Elles sont ensuite réhydratées quelques minutes dans l'eau courante.

Bloquage et perméabilisation : les lames sont placées dans du tampon citrate 0.01 M ; pH 6, d'abord à température ambiante pendant 5 min., puis dans un four à micro-ondes à puissance 8 (750 Watts), 2 fois 5 min. Revenues à température

25 ambiante, les coupes sont rincées dans de l'eau osmosée et cerclées au DAKO pen. Afin d'éliminer les peroxydases tissulaires qui peuvent interférer avec le complexe de révélation et rendre ainsi la réaction ininterprétable, nous utilisons de la H_2O_2 3 % pendant 10 min. Les lames sont ensuite préincubées pendant 30 min. dans un mélange PBS 1x, gélatine 2 g/l, triton 0.25 % et albumine de sérum bovine (BSA) à 3 % pour

30 saturer les sites aspécifiques.

Marquage : l'anticorps primaire de lapin anti β -galactosidase est dilué au 1/1000 dans un mélange de PBS 1x, gélatine 2 g/l et triton 0.025%. Après 1 h d'incubation à température ambiante, un bref rinçage puis quatre autres de 5 min. sont

réalisés avec le mélange ayant servi à diluer l'anticorps. L'anticorps secondaire biotinylé anti-lapin, produit chez l'âne (DAKO), est dilué au 1/200 dans du PBS 1x additionné de gélatine à 2 g/l, et appliqué pendant 30 min. Les lames sont ensuite rincées, d'abord rapidement, puis 4 fois 5 min., avec le milieu de dilution avant
5 d'ajouter le complexe de révélation streptavidine/péroxydase (DAKO) dilué au 1/400 dans le même mélange, pendant 30 min. Après trois lavages de 5 min., le substrat chromogène, la diaminobenzidine (DAB), est ajouté. Le temps de révélation varie de 2 à 20 min. La réaction est stoppée en plongeant les lames dans de l'eau osmosée. Celles-ci sont ensuite contre-colorées dans de l'Hémalun pendant 1 min., rincées
10 rapidement dans de l'eau osmosée puis différenciées dans du LiCO_3 quelques secondes. Elles sont finalement déshydratées puis conservées dans du xylène jusqu'au montage entre lame et lamelle dans de l'eukitt.

Exemple 1 : Construction des adénovirus recombinants défectifs Ad.CMV.ATF, AdK3 et Ad.CMV β gal.

15 Les vecteurs ont été construits selon la méthode générale décrite par Crouzet et al (PNAS vol 94 p1414, 1997). Le détail de la construction des vecteurs Ad.CMV.ATF et AdK3 a été décrit dans la demande WO98/49321 incorporée à la présente par référence.

20 Pour l'AdK3, le transgène de 1 Kb correspond au fragment N-terminal du plasminogène humain (jusqu'au résidu 333) et inclut les 3 premiers domaines kringles de la molécule d'angiotatine.

Pour l'Ad.CMV.ATF, le transgène de 0.5 Kb est un ADNc codant pour le fragment N-terminal de l'uPA murin (acides aminés 1 à 135) et le transgène de l'Ad.CMV β gal comprend un ADNc de 3.1 Kb codant pour le gène rapporteur
25 d'*Escherichia coli*, *lacZ*.

La production et la sécrétion de molécules adénovirales à partir des constructions ont été respectivement vérifiées par Northern-blot et Western-blot. Des tests d'inhibition *in vivo*, de la croissance tumorale, de l'angiogénèse et de la tumorigénèse, ainsi que des tests d'inhibition *in vitro*, de la prolifération cellulaire
30 stimulée par le bFGF ont été réalisées pour les AdK3 et Ad.CMV.ATF. L'activité X-gal de l'Ad.CMV β gal a également été contrôlée.

Le titre moyen des solutions stock des adénovirus recombinants utilisés est de 4.5×10^8 pfu/ml pour l'AdK3, 10^9 pfu/ml pour l'Ad.CMV.ATF et 6.9×10^{10} pfu/ml pour l'Ad.CMV β gal.

Exemple 2 : effet d'un vecteur codant pour un facteur anti-angiogénique dans un modèle de néovascularisation cornéenne chez le rat.

- 5 L'effet de la lentille sur l'œil droit de l'animal est étudié en fonction (1) de la durée du contact avec la cornée –une ou deux semaine(s)-, (2) de la présence ou non du vecteur codant pour un facteur anti-angiogénique – (3) de la néovascularisation ou non de la cornée.
- 10 Pour rechercher un effet thérapeutique “préventif” de l'adénovirus sur la néovascularisation cornéenne, la lentille est placée sur la cornée immédiatement après la pose des 3 sutures interrompues, tandis qu'un effet “curatif” est étudié en posant la lentille sur des yeux présentant déjà une néovascularisation cornéenne, depuis une ou deux semaine(s).
- 15 Chaque adénovirus est testé sur un lot de 10 rats : 5 pour évaluer l'effet préventif et 5 pour l'effet curatif. Un lot de 10 rats avec une lentille imprégnée de véhicule sert de témoin.

Evaluation des deux modèles animaux de néovascularisation cornéenne

- 20 Le modèle d'induction de néovaisseaux cornéens par la pose de trois sutures interrompues est très efficace puisque 100% des animaux opérés présentent une néovascularisation cornéenne, et la cornée des yeux contrôles contralatéraux est avasculaire. Les vaisseaux sont attirés vers le centre de la cornée, à partir des arcades vasculaires limbiques et prolifèrent dans les couches superficielles de la cornée dès la première semaine suivant l'intervention.
- 25 Le score moyen de chaque œil, indiquant le développement de la néovascularisation cornéenne, est de 7 ± 2 , deux semaines après la pose des sutures. A ce moment-là, la néovascularisation cornéenne est maximale. Dans le modèle d'induction par grattage superficiel de la cornée seulement 70% des rats développent une néovascularisation cornéenne. Toutefois, celle-ci est plus homogène que celle du
- 30 modèle précédent car l'ensemble des quatre quadrants de l'œil participe au développement de la néovascularisation contrairement à ce que l'on observe dans le

modèle des sutures où le nombre de quadrants impliqués est variable. Cette variabilité de l'étendue de la surface cornéenne néovascularisée est étroitement dépendante de la position des sutures par rapport au limbe, de leur profondeur dans le stroma et de leur taille. Le score moyen de chaque d'œil est de 8 ± 2 , deux semaines après grattage.

- 5 Sur une coupe de cornée incluse dans la paraffine, colorée avec un mélange d'acide périodique/base de Schiff/hématoxyline, les néovaisseaux apparaissent de façon prédominante dans l'épithélium cornéen, mais également dans le stroma et au contact de l'endothélium cornéen.

10 Efficacité du transfert des vecteurs adénoviraux par imprégnation préalable d'une lentille de contact

- 15 Résultats macroscopiques : après incubation avec la solution X-gal, les cupules oculaires de tous les yeux ayant été exposés à une lentille imprégnée avec de l'adénovirus β -galactosidase à 2×10^7 pfu/ μ l présentent une coloration bleue ponctuée et très diffuse sur toute la cornée du rat nouveau-né et sur une large région de la cornée des animaux adultes. La coloration bleue n'est retrouvée sur aucun des yeux témoins.

Résultats microscopiques : le marquage obtenu par révélation colorimétrique de la β -galactosidase sur coupes congelées de cornées normales prédomine dans le noyau des cellules épithéliales cornéennes.

- 20 Sur coupes de cornées néovascularisées incluses dans la paraffine, le marquage obtenu par immunohistochimie est principalement retrouvé dans les noyaux des cellules endothéliales cornéennes, mais aussi dans celui des cellules épithéliales cornéennes et épithéliales des corps ciliaires. Les kératocytes du stroma cornéen ainsi que des cellules endothéliales intrastromales pathologiques sont également marquées (Figure 1). Malgré le signal de localisation nucléaire adjoint au transgène lacZ, 25 certaines cellules présentent un marquage dans le cytoplasme, quelle que soit la technique de révélation.

- 30 Des résultats identiques sont obtenus à l'aide d'adénovirus codant pour l'ATF murin ou pour l'angiostatine humaine. Cela a pu être démontré par des réactions immunohistochimiques spécifiques, réalisées sur coupes de globes oculaires de rat inclus dans la paraffine.

Effet anti-angiogénique des lentilles préalablement imprégnées d'adénovirus Ad.CMV.ATF et AdK3.

Des lentilles imprégnées de véhicule et placées sur une cornée sans néovascularisation n'ont aucun effet angiogénique significatif.

- 5 Aucun phénomène inflammatoire et aucune néovascularisation cornéenne ne sont induits par les lentilles imbibées d'Ad.CMV β gal à 2×10^7 pfu/ μ l

De même, les lentilles d'Ad.CMV.ATF (10^6 pfu/ μ l) et d'AdK3 (4.5×10^5 pfu/ μ l) n'induisent aucune réaction inflammatoire sur la cornée, aucune néovascularisation, ni de disparition de la vascularisation limbique.

- 10 Une lentille imbibée d'Ad.CMV.ATF placée sur une cornée immédiatement après la pose des trois sutures interrompues, prévient le développement de la néovascularisation attendue suite à la mise en place de ces trois sutures, pendant la première semaine. Cet effet persiste après deux semaines. On observe le même effet anti-angiogénique au bout d'une semaine de contact avec la cornée, avec une lentille
- 15 imbibée d'AdK3 (Figure 3)

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un vecteur comprenant un acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée par imprégnation d'une lentille souple et application de ladite lentille sur la cornée pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations cornéennes.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant pour le facteur anti-angiogénique est un acide nucléique codant pour un polypeptide choisi parmi le fragment N-terminal de l'activateur du plasminogène uPA (ATF), l'angiostatine, l'endostatine, le fragment 16 kDa de la prolactine ou le facteur plaquettaire 4 (PF-4) ou une combinaison d'acides nucléiques codant pour au moins deux de ces facteurs.

3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le facteur anti-angiogénique est choisi parmi le fragment N-terminal de l'activateur du plasminogène uPA (ATF) et l'angiostatine K3.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le vecteur est un plasmide, un cosmide ou tout ADN non encapsidé par un virus.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le vecteur est un virus recombinant, de préférence dérivé d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un lentivirus, d'un virus de l'herpès ou d'un virus adéno-associé.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le virus recombinant est un adénovirus recombinant défectif.

7. Utilisation selon la revendication 5 ou 6 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à une administration par instillation intraoculaire comprenant de $1 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^{12}$ pfu / ml et de préférence entre $1 \cdot 10^8$ et $1 \cdot 10^{10}$ pfu / ml.

8. Procédé de préparation d'un médicament utile pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations cornéennes, caractérisé en ce que l'on mélange un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique codant

pour un facteur anti-angiogénique avec un ou plusieurs adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

- 5 9. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur recombinant défectif comprenant au moins un acide nucléique codant pour un facteur anti-angiogénique caractérisée en ce qu'elle est formulée pour une administration intraoculaire.

10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend de $1 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^{12}$ pfu / ml et de préférence entre $1 \cdot 10^8$ et $1 \cdot 10^{10}$ pfu / ml.

- 10 11. Kit comprenant un récipient contenant une composition selon l'une des revendications 9 à 10 et au moins une lentille de contact.

12. Utilisation du kit selon la revendication 11 pour la préparation d'un médicament destiné à être administré par imprégnation d'une lentille pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des néovascularisations cornéennes.

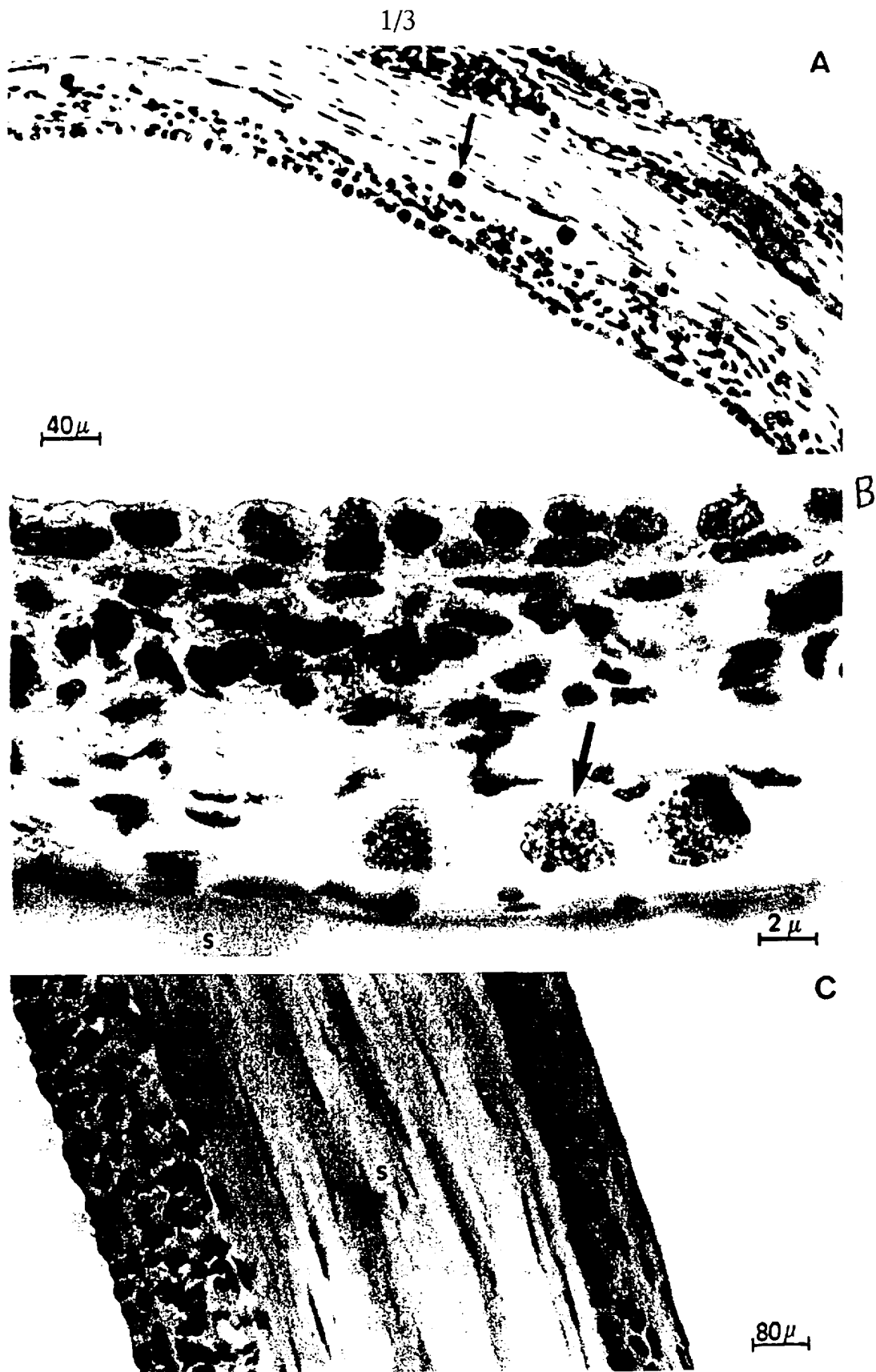


Figure 1



Figure 2

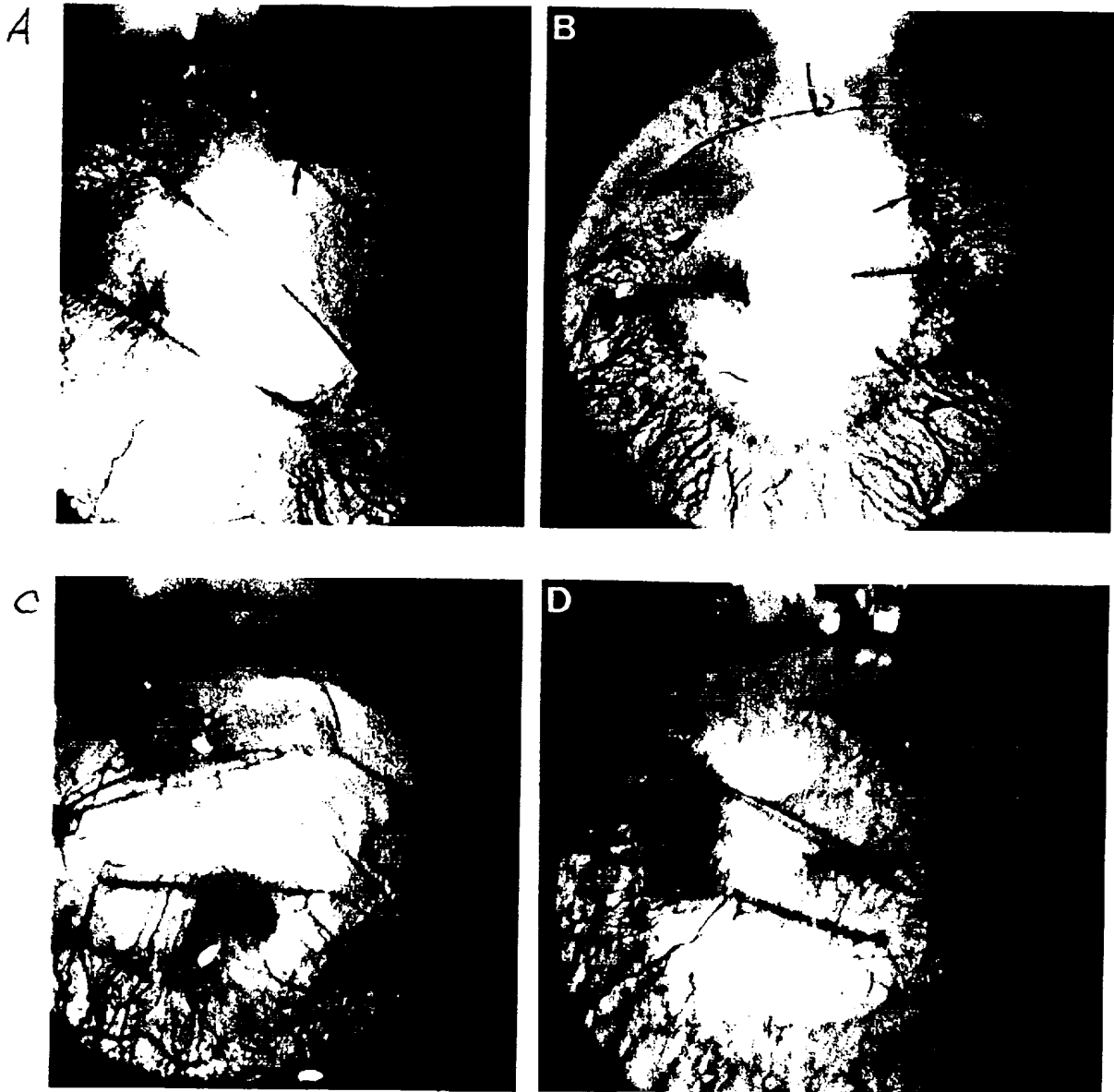


Figure 3

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2803207

N° d'enregistrement
national

FA 586592
FR 9916780

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	US 5 827 702 A (CUTHBERTSON R ANDREW) 27 octobre 1998 (1998-10-27) * exemple 5 *	1-3,5-10	A61K48/00 A61P27/02
A	* le document en entier *		
A	WO 94 20146 A (INST NAT SANTE RECH MED ;BRIAND PASCALE (FR); PERRICAUDET MICHEL () 15 septembre 1994 (1994-09-15)		
Y	DUEÑAS Z ET AL: "Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules" INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE (IOVS), vol. 40, no. 11, octobre 1999 (1999-10), pages 2498-2505, XP000952634 * page 2505, colonne 2, ligne 24 - page 2506, colonne 1, ligne 2 * * le document en entier *	1-3,5-10	
A	US 5 759 547 A (MAIONE THEODORE E) 2 juin 1998 (1998-06-02)		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	WO 99 29855 A (BETH ISRAEL HOSPITAL ;SUKHATME VIKAS P (US)) 17 juin 1999 (1999-06-17)		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 octobre 2000		Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	