



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1996/07/10  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1997/01/30  
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2009/10/13  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1998/01/06  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1996/001076  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1997/002840  
(30) Priorité/Priority: 1995/07/10 (FR95/08316)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/87* (2006.01),  
*A61K 31/70* (2006.01), *A61K 38/16* (2006.01),  
*A61K 39/395* (2006.01), *A61K 47/48* (2006.01),  
*A61K 48/00* (2006.01), *C07K 16/18* (2006.01),  
*C12N 5/18* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:  
AVRAMEAS, STRATIS, FR;  
BUTTIN, GERARD, FR;  
TERNYNCK, THERESE, FR;  
NATO, FARIDABANO, FR;  
AVRAMEAS, ALEXANDRE, FR

(73) Propriétaires/Owners:  
INSTITUT PASTEUR, FR; ...

(54) Titre : IMMUNOVECTEURS UTILISABLES POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE ET INTRANUCLEAIRE  
(54) Title: IMMUNOVECTORS FOR THE INTRACELLULAR AND INTRANUCLEAR TRANSPORT

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne un produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un immunovecteur caractérisé à la fois par la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes du principe biologiquement actif, et par l'affinité de l'immunovecteur pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans ces noyaux.



(73) **Propriétaires(suite)/Owners(continued):**UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI), FR

(74) **Agent:** ROBIC

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b><br><b>A61K 47/48</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/02840</b><br><b>(43) Date de publication internationale:</b> 30 janvier 1997 (30.01.97)                                                                                                                                                                                                  |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/01076<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 10 juillet 1996 (10.07.96)<br><br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>95/08316                      10 juillet 1995 (10.07.95)                      FR<br><br><b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cédex 06 (FR).<br><br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> AVRAMEAS, Stratis [FR/FR]; 1, rue Sarasate, F-75015 Paris (FR). BUTTIN, Gérard [FR/FR]; 63, rue Croulebarbe, F-75013 Paris (FR). TERNYNCK, Thérèse [FR/FR]; 39, boulevard Garibaldi, F-75015 Paris (FR). NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160 Antony (FR).<br><br><b>(74) Mandataires:</b> GUTMAN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).                                                                                                                 |           | <b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i><br><i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> |
| <b>(54) Title:</b> IMMUNOVECTORS FOR THE INTRACELLULAR AND INTRANUCLEAR TRANSPORT<br><b>(54) Titre:</b> IMMUNOVECTEURS UTILISABLES POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE ET INTRANUCLEAIRE<br><br><b>(57) Abstract</b><br><p>A product for coupling a biologically active principle with an immunovector, characterised in that the immunovector is capable of enabling the biologically active principle to be internalised into eukaryotic cells, and in that said immunovector has an affinity for the cell DNA to such an extent that it can transfer the biologically active principle into or to the immediate vicinity of the cell nuclei.</p><br><b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention concerne un produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un immunovecteur caractérisé à la fois par la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes du principe biologiquement actif, et par l'affinité de l'immunovecteur pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans ces noyaux.</p> |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## IMMUNOVECTEURS UTILISABLES POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE ET INTRA-NUCLEAIRE

5

La présente invention est relative au transfert actif d'haptènes, de protéines, d'acides nucléiques et autres molécules dans le noyau de  
10 cellules eucaryotes. Cette invention revêt une importance majeure puisqu'elle peut être appliquée à divers domaines, notamment celui de la thérapie génique et des vaccins.

La thérapie génique demeure conditionnée par un nombre considérable de  
15 paramètres, parmi lesquels le développement de vecteurs capables de transporter à travers le cytoplasme de ces cellules de l'organisme de l'hôte des principes actifs doués de propriétés spécifiques prédéterminées dans les noyaux de cellules de l'organisme en l'absence d'altérations génétiques associées à l'utilisation de ces vecteurs, et la non-dégradation de l'activité  
20 biologique des principes actifs transférés. On sait qu'à ce jour toutes ces conditions sont loin d'être réunies (1).

En effet, les méthodes actuelles utilisées couramment pour transférer l'ADN dans les cellules sont les suivantes : des méthodes générales, non  
25 sélectives, qui utilisent la propriété de l'ADN de coprécipiter avec le phosphate de calcium ou le DEAE-dextran, ou bien l'introduction directe de l'ADN dans les cellules sous l'effet d'un champ électrique (électroporation). Ces méthodes sont très toxiques pour les cellules, entraînant une grande mortalité et une grande variabilité selon les cellules utilisées. D'autres  
30 méthodes utilisent un ciblage de l'entrée du gène dans les cellules par des

récepteurs présents à leur membrane. L'ADN peut alors pénétrer dans la cellule par l'intermédiaire soit d'un ligand spécifique de ces récepteurs : asialorosomucoïde (2), insuline (3) ou transferrine (4), soit d'anticorps spécifiques de constituants membranaires (5). Le complexe ADN/ligand pénètre dans la cellule par un processus d'endocytose. La transfection est donc limitée par une destruction importante du complexe dans les vésicules lysosomales, et différentes méthodes ont été proposées pour pallier ces inconvénients, notamment le blocage du compartiment lysosomal par la chloroquine ou l'addition simultanée d'adénovirus qui échappent au compartiment endosomal en détruisant la membrane des vésicules d'endocytose (6).

La présente invention a pour but de mettre à disposition un nouveau type de vecteurs à la fois plus efficaces et d'une plus grande innocuité que les vecteurs viraux dont l'utilisation est envisagée à ce jour.

L'invention concerne donc un produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un de ces nouveaux vecteurs, ci-après dénommés "immunovecteurs", ledit produit de couplage étant caractérisé, à la fois par la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes de principes biologiquement actifs liés de manière covalente ou non covalente à ces immunovecteurs, et par leur affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de rendre ledit immunovecteur apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans les noyaux de ces cellules.

Plus spécifiquement la présente invention concerne un produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un immunovecteur, ledit immunovecteur étant formé d'un anticorps ayant une affinité pour un acide

2a

nucléique ou un fragment de cet anticorps conservant cette affinité, ledit produit de couplage étant caractérisé à la fois par la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes du principe biologiquement actif, et par l'affinité de l'immunovecteur pour l'ADN de ces cellules, au point de rendre ledit immunovecteur apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans ces noyaux.

Plus spécifiquement la présente invention concerne aussi une cellules eucaryotes contenant des molécules actives, caractérisées en ce que lesdites molécules ne sont pas naturellement incorporables aux noyaux desdites cellules, ou ont un taux d'expression faible dans lesdites cellules, lesdites molécules étant présentées dans ces cellules à proximité immédiate de leurs noyaux ou dans ceux-ci, et couplées à un immunovecteur caractérisé par son affinité pour l'ADN de ces cellules, à l'état de produit.

Plus spécifiquement la présente invention concerne aussi un hybridome déposé à la CNCM le 30 juin 1995 sous le numéro d'enregistrement: I-1605, ou I-1606.

Plus spécifiquement la présente invention concerne aussi un procédé de transfert *in vitro* d'un principe actif dans les noyaux de cellules eucaryotes choisies, caractérisé par:

- le couplage de ce principe actif à un immunovecteur, ledit immunovecteur étant un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique ou un fragment de cet anticorps conservant cette affinité, et possédant à la fois la capacité à permettre l'internalisation de ce principe actif dans ces cellules eucaryotes et une affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transporter ce principe biologiquement actif à proximité immédiate ou dans les noyaux de ces cellules, et

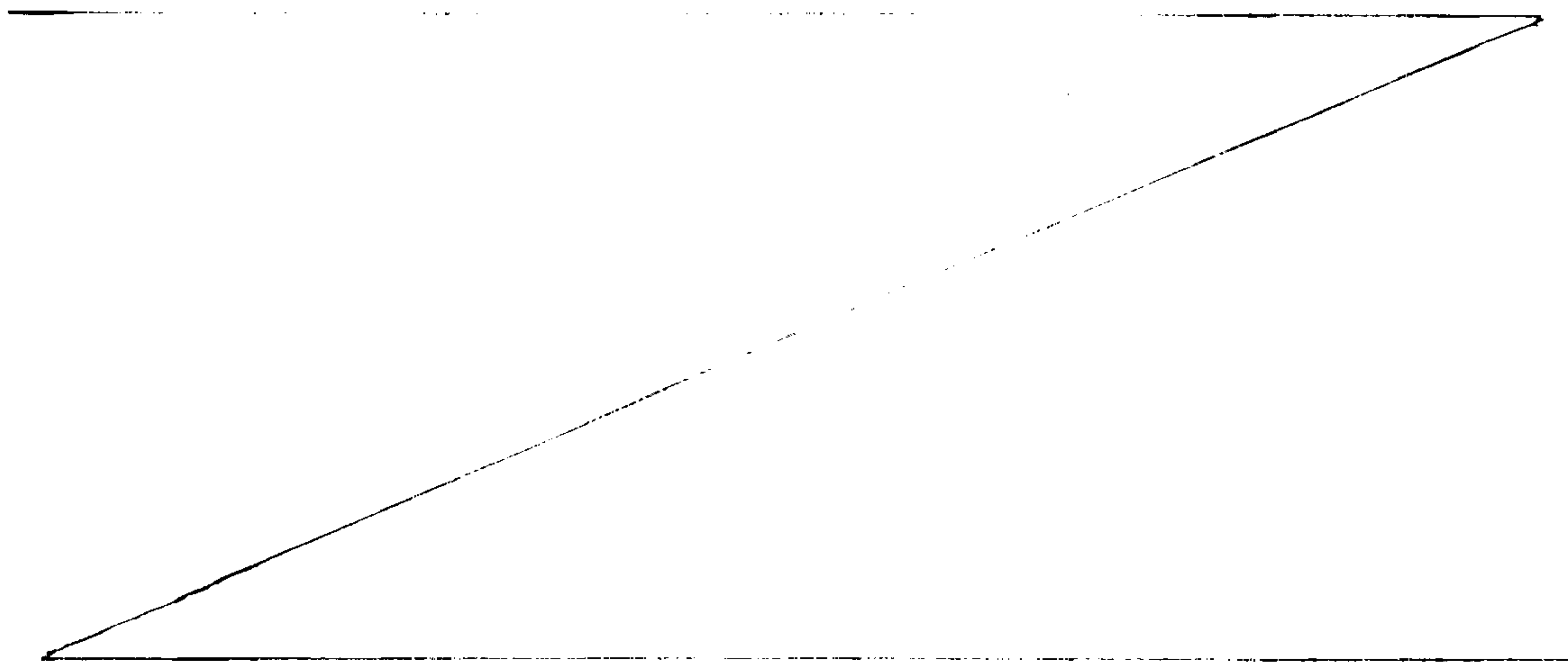
2b

– l'incubation dudit principe actif couplé audit immunovecteur avec lesdites cellules eucaryotes, ledit principe actif couplé audit immunovecteur étant transféré dans le noyau desdites cellules.

Plus spécifiquement la présente invention concerne aussi une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un produit conforme, dans lequel le principe biologiquement actif est un principe actif de médicament ou de vaccin et l'immunovecteur est compatible avec l'organisme de l'hôte auquel le médicament est destiné.

- 10 Plus spécifiquement la présente invention concerne aussi l'utilisation du produit pour exprimer *in vitro* dans des cellules réceptrices une séquence nucléotidique hétérologue par rapport à l'ADN de l'hôte.

Ces immunovecteurs consistent de préférence en des anticorps ou fragments d'anticorps aptes à reconnaître des séquences d'ADN au sein de ces cellules, et auxquels peuvent être liés de manière covalente ou non covalente des principes biologiquement actifs, ces anticorps ou fragments d'anticorps étant en outre capables de transporter in vitro et in vivo ces



principes biologiquement actifs à travers les membranes et le cytoplasme de ces cellules, et à les transférer à proximité ou même dans le noyau de ces cellules.

- 5 Il est entendu que dans la présente description le terme "principe biologiquement actif" concerne toute molécule, macromolécule, groupe de molécules possédant l'activité biologique du genre en question.

10 L'invention est également relative à un procédé de transfert, notamment d'haptènes, de protéines et/ou d'acides nucléiques dans le noyau de cellules particulièrement de cellules eucaryotes, ce procédé étant basé sur l'utilisation des propriétés desdits immunovecteurs.

15 L'existence d'anticorps capables de pénétrer à l'intérieur de noyaux de lymphocytes humains lorsque ces cellules sont incubées in vitro dans un milieu de culture contenant un sérum provenant de malades atteints de lupus érythémateux disséminé (LED), a été rapportée pour la première fois par Alarcon-Segovia et al. en 1978 (7). Par la suite, la même équipe a démontré que ces anticorps sont d'isotype IgG et sont capables de réagir  
20 avec des acides ribonucléiques, libres ou complexés avec des protéines (8). Récemment, ce type d'anticorps a été détecté chez la souris lupique MRL lpr/lpr, mais également chez la souris NZB présentant un syndrome de maladie hémolytique auto-immune et même chez la souris normale BALB/c. Certains anticorps monoclonaux, préparés à partir de la rate de  
25 ces souris, se sont avérés capables de pénétrer in vitro dans le noyau de cellules maintenues en culture (10-13). Comme chez l'humain, il a été noté que ces anticorps monoclonaux étaient capables de reconnaître des acides nucléiques. De plus, il a été montré que ces anticorps sont aussi capables, lorsqu'ils sont injectés chez la souris, de pénétrer dans plusieurs  
30 types de cellules, pour se retrouver dans leurs noyaux (11).

L'invention découle de la découverte que ce type d'anticorps ou des fragments de ces anticorps pouvaient aussi être utilisés comme vecteurs, ci-après « immunovecteurs » aptes à transporter des principes biologiquement actifs, tels que des haptènes, des protéines, et des acides nucléiques à travers les membranes et le cytoplasme des cellules correspondantes, et à assurer leur transfert dans le noyau desdites cellules.

Ces anticorps peuvent être obtenus sous forme polyclonale à partir d'un sérum, en particulier d'un animal préalablement immunisé contre des fragments d'acide nucléique porteurs de l'épitope correspondant, ou sous forme monoclonale, à partir d'hybridomes sécréteurs de tels anticorps.

Tout type de liaison, chimique ou non, peut être mise en oeuvre pour assurer le couplage d'un immunovecteur du type anticorps ou fragment d'anticorps ayant une affinité pour les acides nucléiques au principe biologiquement actif, par exemple un haptène ou un acide nucléique, aux fins de le transporter à travers les membranes et le cytoplasme des cellules, et à assurer le transfert de ces principes actifs dans le noyau.

20

De façon préférée l'on aura recours à un mode de couplage chimique, permettant la réalisation de liaisons covalentes ou non covalentes.

Des produits de couplage préférés sont ceux dont les immunovecteurs sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules en culture dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transporté, suivie, après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin d'une détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction

30

immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur.

Parmi les immunovecteurs préférés de la présente invention, on mentionnera les anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique, ou un fragment de ceux-ci, ce dernier conservant cette affinité.

Les anticorps ayant également la capacité de se fixer sur les cellules, en particulier des cellules lymphoïdes sont également utilisables. Cette dernière catégorie d'immunovecteurs peut également être sélectionnée par un test, lequel peut alors aussi comprendre l'incubation des immunovecteurs à l'étude avec des cellules lymphoïdes, le lavage desdites cellules lymphoïdes, l'incubation de ces dernières avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et la détermination du nombre de cellules positives dans chaque population.

Dans une réalisation, les cellules lymphoïdes utilisées sont des splénocytes de souris auto-immunes présentant un syndrome lupique.

Un immunovecteur préféré pour le produit de couplage est choisi parmi les IgG monoclonales, les fragments (Fab')<sub>2</sub> ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.

Préférentiellement, cet immunovecteur est une immunoglobuline, plus particulièrement une IgG portant une activité anti-ADN, et provenant d'individus normaux.

En outre, cet immunovecteur peut être une IgG portant une activité anti-ADN, et provenant d'individus présentant des syndromes auto-immuns, plus particulièrement des syndromes de lupus érythémateux disséminé.

Dans une réalisation particulière de l'invention, l'immunovecteur couplé au principe actif est un anticorps bi-spécifique reconnaissant d'une part l'ADN, et d'autre part une protéine telle que Tat, Rev du rétrovirus VIH, ainsi que des marqueurs de surface tels que CD3, CD4, CD8, CD19, et CD34.

5

Préférentiellement, le principe biologiquement actif couplé à l'immunovecteur est une molécule choisie parmi notamment des acides nucléiques, des protéines notamment les enzymes, par exemple la peroxydase, des haptènes notamment la biotine ou la fluorescéine, les  
10 activateurs ou inhibiteurs d'enzymes et les médicaments.

Dans une réalisation préférée, l'acide nucléique couplé est un polynucléotide, l'immunovecteur étant une IgG, le couplage s'effectuant par l'intermédiaire de la p-benzoquinone à raison d'une molécule  
15 d'immunovecteur pour 4 molécules de polynucléotide.

Un principe biologiquement actif utilisé de préférence, est constitué par un plasmide destiné à s'intégrer dans le noyau des cellules cibles pour l'expression d'une protéine codée par un gène contenu dans ledit  
20 plasmide. Lorsqu'un tel plasmide est couplé à un immunovecteur du type anticorps, ayant de l'affinité pour l'ADN, cet immunovecteur est, de façon préférée, préalablement couplé à un agent capable d'induire un effet de compactage sur l'ADN, cet agent étant de préférence la polylysine.

25 En effet, la polylysine, qui par ses propriétés cationiques est capable de compacter l'ADN, favorise la transfection des cellules. Le couplage de polylysine à l'immunovecteur, qui s'effectue à l'aide d'un agent de couplage, plus particulièrement un carbodiimide tel que l'EDC (1-(3-dimethylaminopropyl)-1'-ethyl carbodiimide)., permet à l'ADN de réagir  
30 avec celle-ci. Cela a pour effet d'induire la libération du site actif de

l'anticorps qui peut être parfois masqué lorsque l'anticorps est couplé à un principe actif de la taille d'un plasmide.

5 D'autres agents susceptibles d'avoir, grâce à leurs propriétés cationiques, un effet de compactage sur l'ADN (2-6), peuvent aussi être couplés à l'immunovecteur pour remplir une telle fonction.

10 De manière plus spécifique, un principe biologiquement actif utilisé préférentiellement est constitué par un gène destiné à s'intégrer dans le génome des cellules cibles, notamment par recombinaison homologue, plus particulièrement un ADN "nu" contenant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide originaire de cellules bactériennes ou eucaryotes, de cellules fongiques, ou de virus, ce polypeptide ayant des propriétés vaccinales.

15 Avantageusement, ce principe actif permet l'immortalisation de types cellulaires choisis, particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et T, et les cellules hématopoïétiques, notamment d'origine humaine.

20 De façon encore préférée, ce principe biologiquement actif est un oligonucléotide antisens permettant l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique, par exemple dans les cellules infectables par un rétrovirus VIH, ou dans des cellules tumorales.

25 Ainsi, les inventeurs ont d'une part tenté d'obtenir à partir de la rate de souris autoimmunes (NZB x NZW)F1, présentant un syndrome lupique, des anticorps monoclonaux IgG qui ont été sélectionnés pour leur capacité à réagir avec l'ADN mais aussi, pour leur capacité à pénétrer jusqu'au  
30 noyau des cellules. Parallèlement, des anticorps polyclonaux réagissant avec l'ADN et pouvant pénétrer dans les noyaux des cellules ont été isolés

par chromatographie d'affinité. Cette chromatographie a été appliquée, soit à un "pool" de sérums de patients normaux ou à un sérum individuel normal, et de préférence à des sérums provenant de patients atteints d'infections, particulièrement à un sérum de patients normaux atteints de  
5 LED, soit à un sérum de souris (NZB x NZW)F1.

Dans un procédé de sélection d'immunovecteurs selon la présente invention, le test de pénétration cellulaire des immunovecteurs comprend une première incubation de lignées cellulaires eucaryotes dans un milieu  
10 contenant lesdits immunovecteurs de préférence en concentration croissante, puis la fixation et, si besoin, la perméabilisation, ou vice-versa, de ces cellules, suivie d'une incubation desdites lignées cellulaires avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués de préférence à la fluorescéine ou à la peroxydase, et la localisation des anticorps ainsi  
15 marqués à proximité des noyaux desdites cellules ou mieux encore à l'intérieur des noyaux. Les lignées cellulaires sont notamment choisies parmi les fibroblastes, les thymocytes ou les splénocytes.

Sans que les conditions réactionnelles qui suivent aient un caractère  
20 limitatif, il peut-être mentionné que la première incubation est souvent effectuée à 37°C, durant environ 2 à 8 heures avec des concentrations d'immunovecteurs d'environ 1 à 70 µg/ml, sur des lignées cellulairesensemencées à une concentration allant de  $5 \times 10^3$  à  $5 \times 10^6$  cellules par millilitre.

25

Dans une des réalisations du procédé, la lignée cellulaire est une lignée fibroblastique en croissance exponentielleensemencée à une concentration de  $2 \times 10^4$  cellules par millilitre, ou des thymocytes ou des splénocytes de souris BALB/c lesquels sont mis en suspension à raison  
30 d'environ  $10^6$  cellules par millilitre.

Par ailleurs, l'invention concerne un procédé de préparation de produit de couplage immunovecteur-molécule(s), les immunovecteurs étant choisis parmi les anticorps, plus particulièrement les IgG obtenus selon le procédé de sélection, les fragments (Fab')<sub>2</sub> ou (Fab'), ou tout polypeptide  
5 correspondant au site des anticorps ou fragments d'anticorps impliqués dans le transport des molécules.

Dans le procédé de préparation d'un produit de couplage selon l'invention, il est fait en sorte qu'à chaque immunovecteur est couplée au moins une molécule de produit biologiquement actif, ladite molécule étant liée à  
10 l'immunovecteur de préférence de façon covalente.

Les exemples qui suivent illustrent des conditions dans lesquelles, des haptènes comme la fluorescéine et la biotine, des petites molécules comme des hormones, des protéines notamment des enzymes, des  
15 inhibiteurs ou activateurs d'enzymes et des médicaments, par exemple des antiviraux tels que l'acyclovir ou l'AZT, peuvent être activement transportées à travers le cytoplasme des cellules traitées et transférées dans le noyau desdites cellules. En particulier, la fluorescéine a été couplée aux groupements aminés libres des immunovecteurs par  
20 l'intermédiaire d'un groupement actif isothioyanate et la biotine par l'intermédiaire d'un ester succinimide actif. Le couplage des haptènes ou autres à l'immunovecteur peut être effectué par l'intermédiaire d'autres réactifs ou groupes de pontage homo- ou hétérobifonctionnels connus dans la littérature comme les imidoesters et N-hydroxy succinimydil esters  
25 pouvant réagir avec les groupements aminés, par exemple des dérivés de groupes alkyle, haloaryle, haloacetyl et pyridyl disulfure réagissant préférentiellement maléimides, ou par l'intermédiaire de avec des groupements sulfhydryle, des carbodiimides, ainsi que des molécules portant des groupements photoactivables comme l'azidobenzoyl hydrazide  
30 (13)..

En outre, les inventeurs ont préparé des produits de couplage où l'immunovecteur est un anticorps bi-spécifique contre un antigène cible, construit, soit par voie chimique soit par voie du génie génétique, et ont parallèlement immunisé des individus, par exemple des souris avec lesdits  
5 antigènes cibles, et sélectionné des immunovecteurs anticorps bi-spécifiques réagissant préférentiellement avec lesdits antigènes cibles, de sorte que l'action des immunovecteurs soit spécifiquement dirigée.

Des techniques relatives à la synthèse d'anticorps bi-spécifiques ont été  
10 notamment décrites par Porstmann et al en 1984 (16), une étude intitulée "Development of a bispecific monoclonal antibody for use in molecular hybridisation" ayant été par ailleurs publiée en 1994 par Auriol et al (17).

De manière avantageuse, les anticorps bi-spécifiques utilisés dans ce  
15 procédé reconnaissent entre autres les protéines Tat, Rev du rétrovirus VIH, ainsi que des marqueurs de surface, CD3, CD4, CD8, CD19, et CD34.

Par ailleurs, la présente invention concerne un procédé de transfert d'un principe actif dans les noyaux de cellules eucaryotes choisies, caractérisé  
20 par le couplage de ce principe actif à un immunovecteur possédant à la fois la capacité à permettre l'internalisation de ce principe actif dans ces cellules eucaryotes et une affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transporter ce principe biologiquement actif à proximité immédiate ou dans les noyaux de ces cellules.

25

Ce principe biologiquement actif peut être couplé de façon covalente ou non covalente à l'immunovecteur.

Préférentiellement, ce procédé de transfert est caractérisé en ce que  
30 l'immunovecteur entrant dans la constitution de ce produit est choisi parmi ceux qui sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire

comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transporté, suivie après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin la détection à proximité  
5 immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur.

10 Dans une réalisation préférée du procédé de transfert selon l'invention, l'immunovecteur utilisé est formé d'un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique, ou d'un fragment de cet anticorps conservant cette affinité.

15 Cet immunovecteur utilisé dans ce procédé est préférentiellement choisi parmi les anticorps, de préférence des IgG monoclonales, les fragments (Fab')<sub>2</sub> ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.

20

Avantageusement, une fois le produit de couplage immunovecteur/principe actif préparé, il peut être utilisé pour le transfert intranucléaire d'autres molécules. Ainsi, au conjugué fluorescéine/immunovecteur expérimenté, on peut associer un anticorps anti-fluorescéine couplé avec une molécule  
25 tierce, et ainsi transférer ladite molécule tierce dans les noyaux des cellules. De façon similaire, le conjugué biotine/immunovecteur peut permettre la liaison d'un anticorps anti-biotine ou d'avidine-streptavidine couplé avec une molécule tierce à transférer dans les noyaux.

30 Dans la présente invention, on a transféré dans le noyau une enzyme telle que la peroxydase de raifort, mais d'autres protéines possédant des

activités biologiques variées peuvent aussi être utilisées. On a aussi utilisé la peroxydase couplée à l'immunovecteur par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Cependant, d'autres procédés connus dans la littérature, comme ceux décrits dans le cas des haptènes, peuvent être aussi utilisés.

5

Comme dans le cas des conjugués haptènes/immunovecteur, il peut être utilisé, en association avec les conjugués protéine/immunovecteurs, un anticorps anti-protéine couplé avec une molécule tierce pour le transfert intranucléaire de ladite molécule.

10

Dans l'invention ici décrite, bien qu'on ait transféré un polynucléotide dans le noyau, une très grande variété d'acides nucléiques possédant des activités biologiques appropriées peut être également activement transférée au niveau intranucléaire.

15

Ainsi un procédé de transfert de principes actifs selon l'invention permet notamment le transfert de gènes destinés à s'intégrer dans le génome des cellules cibles, notamment par recombinaison homologue plus particulièrement le transfert d'ADN "nu", ce dernier pouvant être

20

notamment utilisé en tant qu'"ADN vaccin".

Une des techniques de recombinaison homologue possible est celle décrite par le Mouellic et al. en 1990 (18).

25

De récents travaux effectués par Whalen R. G. et al ont permis de montrer l'existence d'une réponse immunitaire suite à un transfert d'ADN. Ces travaux qui ont fait l'objet de la demande de brevet WO 95/11307, ont été plus particulièrement appliqués à l'expression de molécules monoclonales du type cytokine IL2 (19).

30

En outre, ce procédé de transfert permet d'introduire des séquences nucléotidiques impliquées dans l'immortalisation de différents types cellulaires, particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et T, et les cellules hématopoïétiques notamment d'origine humaine. A titre de séquences nucléotidiques on peut citer les séquences oncogènes ou des séquences virales associées à des phénomènes de transformation cellulaire.

Il permet également le transfert d'oligonucléotides antisens permettant l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique, par exemple dans les cellules infectables par un rétrovirus tel que VIH, ou les cellules tumorales.

Dans la présente invention, le polynucléotide a été couplé à l'immunovecteur par l'intermédiaire de la p-benzoquinone. Cependant, d'autres procédés connus dans la littérature peuvent être aussi employés.

Par ailleurs, la présente invention est aussi relative aux cellules eucaryotes contenant des molécules actives de préférence au niveau nucléaire, caractérisées en ce que lesdites molécules ne sont pas naturellement incorporables aux noyaux desdites cellules, ou ont un taux d'expression faible dans lesdites cellules. Ces molécules sont présentées dans ces cellules à proximité immédiate de leurs noyaux ou dans ceux-ci, et couplées à un immunovecteur caractérisé par son affinité pour l'ADN de ces cellules, à l'état de produit de couplage selon l'invention.

Parmi les cellules visées par la présente invention, on retrouve notamment les cellules infectables par un virus ou les cellules tumorales.

Entrent également dans le cadre de la présente invention les hybridomes produisant les anticorps selon la présente invention, tels que déposés à la CNCM le 30 juin 1995 sous les numéros I-1605, I-1606, I-1607.

En outre, l'invention est relative à une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un produit de couplage selon l'invention, dans lequel le principe biologiquement actif est un principe actif de médicament ou de vaccin et l'immunovecteur est compatible avec l'organisme de l'hôte auquel le médicament est destiné.

Entre également dans le cadre de la présente invention, l'utilisation du produit de couplage de l'invention pour l'expression dans des cellules réceptrices d'une séquence nucléotidique hétérologue par rapport à l'ADN de l'hôte.

## **EXEMPLES**

15

### **I. PREPARATION D'IMMUNOVECTEURS**

#### **A) Immunovecteurs polyclonaux**

20 Les IgG humaines ou murines sont d'abord isolées par passage d'un mélange de sérums provenant d'individus atteints de lupus érythémateux disséminé - ou de souris lupiques (NZB x NZW)F1 - sur de la protéine A immobilisé sur Sepharose (14).

25 Les IgG isolées sont passées sur une colonne d'ADN immobilisé sur de la cellulose. Les anticorps spécifiques anti-ADN présents dans ces IgG sont fixés sur cet immunoadsorbant ADN-cellulose et élués avec un tampon carbonate bicarbonate de sodium 20  $\mu$ M, pH 10, contenant 5 % de diméthylsulfoxyde (15). On isole ainsi 1 à 2 mg d'anticorps à partir de 10 mg d'IgG. Les anticorps élués sont dialysés, concentrés et conservés à +4°C jusqu'à leur utilisation.

30

B) Immunovecteurs monoclonaux murins

Les splénocytes provenant de souris lupiques (NZB x NZW)F1 sont fusionnés avec le myélome X63 selon le procédé de Köhler et Milstein. Les hybridomes produits sont testés en ELISA pour la sécrétion d'IgG et pour leur activité anti-ADN. Les hybridomes sécréteurs d'IgG anti-ADN sont sous-clonés au moins deux fois et les clones demeurés doublement positifs (IgG + anti-ADN) sont cultivés en masse ou bien des ascites sont préparés à partir de ces clones chez la souris. Dans une expérience typique à partir de la rate d'une souris (NZB x NZW)F1, on a obtenu approximativement 300 puits positifs sécrétant des IgG dont 60 étaient capables de réagir avec l'ADN. Après clonage, 20 clones sécrétaient de l'IgG reconnaissant l'ADN. De ces 20 clones, approximativement la moitié sécrétaient des anticorps capables de pénétrer dans le noyau des cellules alors que les autres n'en étaient pas capables (voir C : test de pénétration intranucléaire des immunovecteurs). Les IgG monoclonales sont isolées à partir des surnageants de culture ou des liquides d'ascites par précipitation avec du sulfate d'ammonium à 45% suivi, après dialyse, par passage sur de la protéine A immobilisé sur Sepharose. Après neutralisation des IgG éluées, les préparations sont dialysées, concentrées et gardées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Les anticorps de souris ci-dessus évoqués seront subséquemment humanisés par l'utilisation d'une des techniques connues, par exemple celle décrite par Riechmann et al. (20).

C) Sélection des immunovecteurs

1) Test de pénétration intranucléaire des immunovecteurs

Deux lignées de fibroblastes - PtK2 provenant de rein de rat kangourou et GMA-32 provenant de rein de hamster - ont été principalement utilisées. Les lames portant les fibroblastes en croissance exponentielle ensemencées à  $2 \times 10^4$  cellules/ml, 24 heures auparavant et mises en culture dans du milieu RPMI 1640 ou MEM (contenant 10 % du sérum de veau foetal, 2mM-L-glutamine et 1 % de pyruvate de sodium) sont incubées à 37°C dans du milieu de culture renouvelé, contenant des quantités choisies d'immunovecteur (1 à 70 µg/ml). Après 2 à 4 heures d'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées avec soit de l'éthanol pendant 10 minutes à -20°C, soit avec 0.2 % de glutaraldehyde et 2 % de formaldéhyde dans du PBS pendant 20 minutes. Après trois lavages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 20 minutes dans du PBS contenant 0.2 % de sérum albumine bovine et 0.5 % de saponine.

15

Les préparations cellulaires sont alors lavées avec du PBS et incubées pendant 45 minutes à 24°C avec des anticorps de lapin ou de mouton anti-immunoglobulines de souris (ou anti-immunoglobulines humaines) marqués avec la fluorescéine ou avec la peroxydase (20 µg/ml). Après lavage, les préparations cellulaires incubées avec l'anticorps fluorescent sont examinées au microscope à fluorescence. Les préparations cellulaires incubées avec l'anticorps marqué avec la peroxydase sont d'abord incubées dans le substrat cytochimique de la peroxydase (diaminobenzidine (DAB) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et, après lavage, la préparation est examinée au microscope optique (14). Le nombre de cellules positives est compté.

Tel que précédemment décrit, des thymocytes de souris ont été aussi utilisés pour tester la pénétration des immunovecteurs dans le noyau. Des suspensions de thymocytes ont été préparées à partir de thymus de souris BALB/c. Les thymocytes, à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml, sont

30

incubées à 37°C pendant 3 heures dans un milieu de culture contenant des quantités croissantes d'immunovecteur (1 à 70 µg/ml). Après lavage et fixation, les lymphocytes sont traités comme les préparations de fibroblastes ci-dessus pour la détection intranucléaire des anticorps.

5

2) Test de fixation des anticorps anti-DNA sur les cellules lymphoïdes

De façon à mettre en évidence une réaction avec les membranes des  
10 cellules,  $10^6$  thymocytes ou splénocytes de souris ont été incubés à froid pendant 45 minutes avec 0,1 ml des différents anticorps monoclonaux dilués dans une solution d'albumine bovine à 0,1 % contenant 0,2 % d'azide de sodium. Après lavage, les cellules sont incubées avec des anticorps anti-IgG de souris fluorescent pendant 45 minutes à froid. Après  
15 lavage, les cellules sont examinées au FACS et le nombre de cellules positives déterminé dans chaque population.

Des 20 anticorps monoclonaux examinés, approximativement la moitié sécrètent des anticorps qui sont capables de pénétrer dans le noyau des  
20 cellules alors que l'autre moitié n'en est pas capable. Une corrélation a pu être établie entre les anticorps monoclonaux pénétrant avec une grande efficacité dans le noyau des cellules (nombre de cellules marquées, dilution limite pour obtenir un marquage) et leur aptitude à marquer les thymocytes et les splénocytes.

25

II PREPARATION D'IMMUNOVECTEURS PORTANT DES HAPTENES, PROTEINES OU ACIDES NUCLEIQUES

A) Préparation de fragments  $F(ab')_2$  et  $Fab'$  d'immunovecteurs

30

Les fragments F(ab')<sub>2</sub> des immunovecteurs sont préparés selon des procédés décrits impliquant une protéolyse par la pepsine suivie d'une réduction par la cystéine pour obtenir le fragment Fab' (14). Ainsi dans 5 ml de tampon citrate-acide citrique 0,1M, pH 3,5, contenant 5 mg d'immunovecteur, on ajoute 150 µg de pepsine et on incube 2 heures à 37°C. Le milieu est ajusté à pH 8 et la préparation filtrée sur une colonne de protéine A-Sepharose pour éliminer les IgG non digérées. Après dialyse contre du PBS, cette préparation de F(ab')<sub>2</sub> est conservée à -20°C jusqu'à utilisation. Pour obtenir les fragments Fab' on ajoute de la cystéine à une concentration finale de 0.02 M dans la préparation du F(ab')<sub>2</sub>. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, on ajoute 0.04 M d'iodoacétamide et on laisse incuber pendant 30 minutes. Cette préparation de Fab' est dialysée contre du PBS et est conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

15 B) Immunovecteurs/haptènes

Couplage à la biotine

Dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,1M, pH7, contenant 1 mg d'anticorps, on ajoute 2 µl d'une solution 0.1M de d-biotine-N-hydroxysuccinimide ester dans du diméthylformamide (1 mg de l'ester actif dans 30 µl de diméthylformamide). On laisse la solution pendant 1 heure à la température du laboratoire et on dialyse contre du PBS à +4°C toute la nuit.

25

Couplage à la fluorescéine

Dans 1 ml d'une solution de carbonate de sodium 0.1M contenant 1 mg d'anticorps, on ajoute 20 µl d'une solution d'isothiocyanate de fluorescéine dans le diméthylsulfoxyde (10 mg/ml). On laisse la solution 3 heures à la température du laboratoire et on dialyse contre du PBS à +4°C.

C) Immunovecteurs/protéinesCouplage avec la peroxydase

Dix milligrammes de peroxydase sont dissous dans 0.2 ml de glutaraldehyde à 1 % dans du tampon phosphate 0.1M pH 6,8. Après incubation à la température du laboratoire pendant 18 heures, la solution est filtrée sur une colonne de Sephadex G25<sup>\*</sup>(0,9 x 60 cm) équilibrée avec NaCl 0.15M pour éliminer l'excès de glutaraldehyde. A cette solution de peroxydase activée, on ajoute 1 ml d'une solution de NaCl 0.15 M contenant 5 mg d'anticorps et 0,2 ml de tampon carbonate-bicarbonate 1M pH 9.5. La solution est gardée à +4°C pendant 24 heures puis additionnée de lysine à la concentration finale de 0.1 M, puis dialysée contre PBS à 4°C.

D) Immunovecteurs/acides nucléiquesPolynucléotides

Le polynucléotide utilisé était composé de 15 nucléotides et portait une fluorescéine en 5' et un groupement NH<sub>2</sub> libre en 3'. Il a été préparé selon des procédés classiques de synthèse nucléique. Ce nucléotide a été couplé à l'immunovecteur par l'intermédiaire de la p-benzoquinone (14). Dans 0,4 ml de tampon phosphate 0.1 M pH 6 contenant 1 mg d'immunovecteur (molécule entière, F(ab')<sub>2</sub> ou Fab') on ajoute 0,1 ml d'éthanol contenant 3 mg de p-benzoquinone. Après une incubation d'une heure à la température du laboratoire la préparation est filtrée sur colonne de Sephadex G-25. La fraction contenant l'immunovecteur activé est additionnée du polynucléotide dans un rapport d'une molécule d'immunovecteur pour 4 molécules de polynucléotide, et la solution

\* (marque de commerce)

ramenée à pH 9.2 avec du tampon carbonate-bicarbonate. Après 18 heures d'incubation à la température du laboratoire, la réaction est arrêtée par addition de lysine à la concentration de 0.1M finale et ensuite dialysée contre du PBS. Cette préparation est conservée à +4°C jusqu'à son utilisation.

### Plasmides

Deux plasmides ont été testés, un premier portant le promoteur de la vimentine en amont du gène codant pour les antigènes T, t du SV40 (pHuVim 830 T,t) (21) et un deuxième portant le gène de la luciférase (22) sous le contrôle d'un promoteur du cytomegalovirus (pCMV-Luc) (5).

Ces plasmides sont maintenus dans la souche E. coli et sont préparés après une culture bactérienne par la méthode standard de lyse en présence de détergent et en milieu alcalin. Les plasmides sont ensuite purifiés par chromatographie sur une colonne de résine (Qiagen Plasmid Kits).

Les immunovecteurs J-20.8 et F-14.6 sont utilisés pour ce travail. Ces anticorps sont préparés par la méthode de préparation d'immunovecteurs monoclonaux précédemment décrite au paragraphe I.B/. Les anticorps sont couplés à de la poly-L-lysine à l'aide d'un agent de couplage, particulièrement un carbodiimide, tel l'EDC (1-(3-diméthylaminopropyl)-1'-ethyl carbodiimide). Dans certains cas, des IgG polyclonales sont ajoutées à l'anticorps anti-ADN dans un rapport 10 : 1 de façon à augmenter la concentration d'IgG dans le milieu et favoriser ainsi le couplage avec la polylysine.

- 2 mg d'anticorps monoclonal (J-20.8 ou F-14.6) dans 1 ml de PBS ou d'IgG polyclonales concentrées à 20 mg/ml sont dialysés toute la nuit contre un tampon MES, 10 mM, pH 5. Deux mg de poly-L-lysine (PM =

18.000) sont dissous dans 1 ml de ce même tampon puis additionnés de 0,2 mg de EDC (dans 50 µl de tampon MES) pendant 30 secondes. La solution de poly-L-lysine est alors ajoutée à la mixture anticorps/EDC et l'incubation se poursuit pendant 2 heures.

- 5           - la préparation est ensuite filtrée sur une colonne protéine A-Sépharose pour séparer l'excès de poly-L-lysine des anticorps conjugués à la polylysine qui sont élués à pH 3 dans les conditions habituelles, neutralisés et dialysés contre du PBS.

10

### III. EXEMPLES DE TRANSFERT DE SUBSTANCES DANS LES NOYAUX DES CELLULES PAR DES IMMUNOVECTEURS ASSOCIES A CES SUBSTANCES

#### 15    A) Transfert in vitro de la fluorescéine

Des fibroblastes de la lignée GM A-32 en culture sur des lamelles de verre sont incubés à 37°C pendant 2 à 4 heures dans du milieu de culture RPMI contenant des quantités croissantes d'immunovecteurs monoclonaux  
20    (anticorps J-20.8 ou fragments Fab'2) marqués avec la fluorescéine. Au bout de ce temps, les cellules sont lavées et fixées comme décrit dans IC1. Après inclusion dans le milieu Mowiol, elles sont examinées au microscope en fluorescence. La presque totalité des noyaux des fibroblastes montre un marquage fluorescent. Par contre, les noyaux de fibroblastes incubés avec  
25    un anticorps monoclonal témoin Ig 2a sans activité anti-ADN, qui ne pénètre pas dans les noyaux, ne présentent pas de fluorescence (Figures 1 et 2).

#### 30    B) Transfert in vivo de la fluorescéine dans les lymphocytes périphériques de la souris

Un mg d'immunovecteur (anticorps monoclonal C-2.1 ou F-4.1 ou d'anticorps témoin (anticorps monoclonal G-14) marqué avec la fluorescéine est injecté à deux souris à raison de 0,2 ml par voie intraveineuse et 0,3 ml par voie intrapéritonéale. Après 5 heures les souris  
5 sont saignées et sacrifiées et les lymphocytes du sang circulant sont analysés par FACS. On note que 60% des lymphocytes du sang périphérique provenant de la souris injectée avec l'immunovecteur sont fluorescents alors qu'aucun des lymphocytes de l'animal témoin ne le sont (Figure 3). L'examen au microscope montre une fluorescence au niveau  
10 des noyaux dans la majorité des cellules.

C) Transfert de la biotine

Des fibroblastes de la lignée PtK2 ( $10^5$ /ml) mis en culture 24 heures  
15 auparavant sont incubés dans un milieu de culture RPMI complet avec des IgG polyclonales anti-DNA humaines marquées avec la biotine en quantités croissantes (5-100  $\mu$ g). Après 3 heures, les cellules sont lavées, fixées et perméabilisées comme décrit dans IC. Les cellules sont ensuite incubées avec du RPMI contenant 1  $\mu$ g/ml de streptavidine marquée à la  
20 peroxydase. Après une heure, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et la peroxydase associée aux cellules est révélée en utilisant le milieu DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les préparations sont incluses dans du Mowiol et examinées au microscope optique. Un grand nombre de noyaux des fibroblastes incubés avec l'IgG anti-ADN sont positifs alors que les cellules  
25 incubées avec des IgG provenant d'individus normaux et marquées avec la biotine, sont négatives.

D) Transfert de la peroxydase

30 Dans les conditions définies en paragraphe IIIC, les fibroblastes PtK2 sont incubés avec des quantités croissantes de fragments Fab' d'un

immunovecteur (anticorps J-20.8) marqué avec la peroxydase. Après 3 heures, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et fixées pendant 20 minutes avec 0.2 % de glutaraldehyde et 2 % de formaldéhyde dans du PBS. Après lavage, on révèle l'activité de la peroxydase par le test coloré DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et on examine les préparations au microscope optique. Une grande proportion de noyaux des fibroblastes incubés avec les fragments Fab' de l'anticorps J-20.8 sont positifs pour la peroxydase, alors que ceux incubés avec l'anticorps contrôle 48.9 sont négatifs.

10 E) Transfert de polynucléotide marqué à la fluorescéine

3 x 10<sup>6</sup> splénocytes, préparés à partir de la rate de souris BALB/c, sont incubés dans 1 ml de RPMI contenant 40 µg/ml d'immunovecteur (J-20.8) ou de son fragment Fab' couplé de manière covalente au polynucléotide. 15 Après trois heures d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées avec du PBS, fixées en 4% de paraformaldéhyde et examinées au microscope. Huit à 10 % des cellules montrent une fluorescence intranucléaire (Figure 4).

20 F) Transfert de plasmide

L'efficacité de transfection a été évaluée par la mise en évidence de la synthèse des protéines codées par ces gènes, soit à l'aide d'anticorps anti-antigène T couplés à la peroxydase, soit par un dosage luminométrique de l'activité de la luciférase sur son substrat la luciférine.

25

Les cellules utilisées sont des fibroblastes de la lignée GMA-32 et des cellules de carcinome Hep 2. Elles sont cultivées dans un milieu complet (milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal, 2mM L-glutamine, 1% de pyruvate de sodium et des antibiotiques), à 37°C de 5% 30 de CO<sub>2</sub>.

Plasmide pHuVim 830 T,t : Les cellules Hep2 sont ensemencées la veille à raison de  $2 \times 10^4$  cellules dans 0,5 ml de milieu complet par puits d'une plaque de 24 puits. Pour la transfection, le milieu est retiré et remplacé par 0,3 ml de milieu complet contenant 20  $\mu$ g d'anticorps-poly-L-lysine et 2  $\mu$ g de plasmide, ou 20  $\mu$ g d'anticorps natifs et 2  $\mu$ g de plasmide ou 2  $\mu$ g de plasmide seul. Après 6 heures, le milieu est changé et la culture est poursuivie en changeant le milieu tous les deux jours et en dédoublant les cellules si nécessaires. L'efficacité de la transfection est testée à des temps variables.

10

Plasmide pCMV-Luc : les cellules GMA-32 sont ensemencées la veille à raison de 7 à  $10 \times 10^4$  cellules / 0,5 ml de milieu complet par puits d'une plaque de 24 puits de milieu de culture complet. Pour la transfection, le milieu est retiré et remplacé par 0,5 ml de milieu complet contenant 8  $\mu$ g de J-20.8/polysine ou de F-14.6/polylysine, ou 20  $\mu$ g de J-20.8 IgG polyclonale et 2  $\mu$ g de plasmide ou 2  $\mu$ g de plasmide seul. Après 6 heures, le milieu est changé. L'efficacité de la transfection est testée 24 heures après le début de la transfection.

## 20 Contrôle de la transfection

Plasmide pHuVim 830 T,t : la synthèse de l'antigène T dans le noyau des cellules transfectées est mise en évidence par une méthode immunocytochimique. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis fixées 10 minutes dans le méthanol à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-antigène T couplé à la peroxydase pendant 1 heure. Après lavage, la peroxydase est révélée par le mélange DAB +  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dans le puits incubé avec le complexe J-20.8-polylysine et plasmide, des cellules isolées et quelques foyers de cellules ont un noyau fortement coloré en brun après 48 heures et après 2 semaines. Le témoin avec l'anticorps natif ou le plasmide seul est négatif.

30

Plasmide pCMV-Luc : l'efficacité de la transfection est mise en évidence par la synthèse de luciférase détectable dans les lysats des cellules transfectées. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la luciférine qui se traduit par un produit détectable dans un luminomètre. Après la culture, les cellules sont lavées dans le PBS puis lysées dans un tampon Tris-phosphate, 25 mM, pH 7,8, contenant 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1% Triton X100, 1% BSA et 15% glycérol. Le lysat est dosé dans un luminomètre par addition automatique d'une solution de luciférine (0,25 mM) et d'ATP (1 mM). Un aliquot du même lysat est dosé quant à sa concentration en protéines par un réactif de Coomassie (Bio-Rad Protein Assay). Les résultats sont exprimés en unités (RLU) par mg de protéines. Comme le montre le tableau, un transfert de gènes a lieu en présence des préparations anticorps J-20.8/polylysine et F-14.6/polylysine alors que les IgG / polylysine n'ont pas d'effet.

L'efficacité de transfection pour un même rapport anticorps/plasmide est 10 fois plus élevée avec la préparation J-20.8 qu'avec le F-14.6. De plus, l'addition d'IgG polyclonales concentrées pendant le couplage à la polylysine semble augmenter l'efficacité de transfection puisque 2 µg de J-20.8 (complexe 20 : 0,5) de la préparation J-20.8-IgG/polylysine donnent des résultats du même ordre de grandeur que 8 µg (complexe 8 : 0,5) de la préparation J-20.8/polylysine.

L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau suivant :

5

| Immunovecteur                      | Rapport<br>anticorps/plasmide<br>$\mu\text{g}/\mu\text{g}$ | Dosage<br>$\text{RLU}/\text{mg} \times 10^4$ |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| J-20.8-IgG<br>/polylysine          | 20 : 0,5<br>20 : 0,5                                       | 5,8<br>63,00                                 |
| J-20.8/<br>polylysine              | 8 : 2<br>8 : 1<br>8 : 1<br>8 : 0,5                         | 2,00<br>15,00<br>38,00<br>13,00              |
| F-14.6/<br>polylysine              | 8 : 0,5                                                    | 1,3                                          |
| IgG/polylysine                     | 20 : 0,5<br>20 : 0,5                                       | < 0,1<br>< 0,1                               |
| Plasmide<br>seul ( $\mu\text{g}$ ) | 2<br>1<br>0,5                                              | < 0,1<br>< 0,1<br>< 0,1                      |

\* \* \*

Dans ce qui précède, les immunovecteurs préférés étaient essentiellement formés par des anticorps anti-ADN ou des fragments de ces anticorps, sous réserve que ces fragments retiennent le site de reconnaissance pour l'ADN entier. Il va naturellement de soi que les immunovecteurs utilisables dans le cadre de l'invention pourraient être constitués de toute autre façon, dès lors qu'ils permettraient également le transport du principe biologiquement actif qui lui serait associé à travers les membranes de ces cellules et leur cytoplasme et son transfert à proximité du noyau des cellules, ou même à l'intérieur de ce noyau.

A titre d'exemples de tels immunovecteurs, on peut citer des conjugués entre une protéine nucléaire, par exemple un histone, une protéine hnRNP, une polymérase ou un facteur associé à cette polymérase, et le produit actif, cette protéine nucléaire étant elle-même (sauf à ce qu'elle soit à elle seule capable d'assurer l'internalisation et le transfert d'un principe biologiquement actif dans le noyau des cellules) conjuguée à l'anticorps anti-récepteur membranaire de la cellule ou à toute autre molécule permettant l'internalisation dans la cellule du conjugué ainsi produit. Dès lors que ce conjugué est apte à diffuser jusque dans le noyau des cellules et que par ailleurs il pourrait à son tour transporter et transférer, comme cela a été défini plus haut, un principe biologiquement actif qui serait couplé à ce conjugué, il constitue un immunovecteur entrant dans le cadre de la présente invention.

Les techniques de sélection qui ont été décrites, plus haut, pour le choix d'immunovecteurs efficaces pour le transfert d'un principe actif dans le noyau des cellules sont tout autant applicables à la sélection des conjugués susmentionnés.

L'homme du métier comprendra qu'un critère de choix supplémentaire pourrait, pour au moins certains des conjugués utilisés, résider dans l'absence d'une intervention indésirable de la protéine nucléaire qu'il contient avec le fonctionnement de la cellule. Il est d'ailleurs à noter que  
5 seule la partie de la protéine intranucléaire portant son site de reconnaissance de l'ADN correspondant est indispensable à la réalisation conforme à l'invention.

### LEGENDE DES FIGURES

#### FIGURE 1 : Transfert "in vitro" de la fluorescéine.

- Marquage des noyaux des fibroblastes GMA 32 par un immunovecteur marqué à la fluorescéine (anticorps J-20.8) en A et B (grossissement x 100).
- C : Absence de marquage avec l'anticorps contrôle fluorescent (x 100).
- D : Un autre champ vu au faible grossissement (x 40).

10

FIGURE 2 : Même préparation que celle de la Figure 1A analysée en microscope confocale. Les fibroblastes GMA 32 sont marqués essentiellement dans le noyau. Sur la figure 2A, on peut noter une fluorescence totale. La figure 2B correspond à l'analyse de l'intensité de fluorescence.

15

#### FIGURE 3 : Transfert de la fluorescéine "in vivo.

Analyse au FACS des cellules du sang périphérique des souris injectées 5 heures auparavant sur la figure 3A, l'anticorps contrôle fluorescent et sur la figure 3B avec un immunovecteur fluorescent l'anticorps (J-20.8). Histogrammes représentant en abscisse, l'intensité de fluorescence (en unité arbitraire) et en ordonnée, le nombre de cellules.

20

FIGURE 4 : Analyse des cellules du sang périphérique (de la figure 3) en microscopie confocale. Sur la figure 4A, on peut noter une fluorescence totale. La figure 4B correspond à l'analyse de l'intensité de fluorescence.

25

#### FIGURE 5 : Transfert "in vitro" d'un nucléotide.

Examen en microscopie confocale d'un splénocyte de souris dans lequel a pénétré le fragment Fab' d'un immunovecteur (anticorps J-20.8) couplé à

30

un nucléotide fluorescent. Sur la figure 5A, on observe une fluorescence totale. La figure 5B correspond à l'analyse de l'intensité de fluorescence.

REFERENCES

- (1) "Non-viral therapy", Current Opinion on Biotechnology, Vol. 5, p. 626-636, (1994), Ledley F.D.
- 5 (2) T.D. McKee, M.E. DeRome, G.Y. WU and M.A. Findeis. Preparation of asioloorosolucoid-polylysine conjugates. Bioconjugate Chem., 5:306 (1994)
- 10 (3) Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of transfecting DNA construct. A.A. Rosenkrank, S.V. Yachmenev, D. A. Jans, N.V. Serebryakova, V.I. Murav'ev, R. Peters and A.S. Sobolev. Exp. Cell Res., 199:323 (1992).
- 15 (4) Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cell. M. Zenke, P. Steinlein, E. Wagner, M. Cotte, H. Beug, and M.L. Birnstiel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655 (1990)
- 20 (5) J.R. Merwin, E.P. Carmichael, G.S. Noell, M.E. DeRome, W.L. Thomas, N. Robert, G. Spitalny and H.C. Chiou. CD5-mediated specific delivery of DNA to T lymphocytes: compartmentalization augmented by adenovirus. J. Immunol. Methods, 186:257 (1995).
- 25 (6) E. Wagner, K. Zatloukal, M. Cotten, H. Kirlappos, K. Mechtler, D.T. Curiel and M.L. Birnstiel. Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099 (1992).

- (7) "Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors", Nature, Vol. 271 (1978), Donato Alarcon-Segovia et al.
- 5 (8) "Antibody penetration into living cells", The Journal of Immunology, Vol. 122, (1979), Donato Alarcon-Segovia et al.
- (9) "V<sub>H</sub> gene analysis of spontaneously activated B cells in adult MRL-lpr/lpr mice", The Journal of Immunology, Vol. 147, pages 1504-1511,  
10 (1991), Mary H. Foster et al.
- (10) "Murine Monoclonal Anti-DBA Antibodies Penetrate Cells, Bind to Nuclei, and Induce Glomerular Proliferation and Proteinuria In Vivo", J. Am. Soc. Nephrol., Vol.2, p.1345-1354 (1992), Demetrios Vlahakos et al.
- 15 (11) "Monoclonal Murine anti-DNA antibody interacts with living mononuclear cells", Arthritis and Rheumatism, Vol. 30 No. 6, p. 669-678, (1987), Okudaira et al.
- 20 (12) "Cross-reactions of anti-DNA autoantibodies with cell surface proteins", Eur. J. Immunol. Vol. 23, p. 383-390, (1993), Eyal Raz et al.
- (13) "Life Science & Analytical Research Products"; Pierce Interchim
- 25 (14) "Techniques immunoenzymatiques", Editions Inserm, (1987), Ternynck T. and Avrameas S.
- (15) "DNA affinity column chromatography: application in the isolation of distinct antibody populations SLE sera., Clin. Exp. Immunol. Vol. 62, pp.  
30 321-328, (1985) Kubota et al.

- (16) "An antibody chimera technique applied to enzyme immunoassay for human alpha-1-fetoprotein with monoclonal and polyclonal antibodies", J. Immunol. Methods, (1984) Vol. 66, p. 179-185, Porstmann B. et al.
- 5 (17) "Development of a bispecific monoclonal antibody for use in molecular hybridization, J. Immunol. Methods, ((1994), Vol. 169, p. 123-133, Auriol J. et al.
- (18) "Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the  
10 Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos", Genetics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990), Vol. 87, p. 4712-4716, Le Mouellic et al.
- (19) "DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen", Clin. Immunology and Immunopathology,  
15 (1995), Vol. 75, p. 1-12, Whalen R. G. et al.
- (20) "Rehasping human antibodies for therapy", Nature, (1988), Vol. 332, p. 323-327, Riechmann et al.
- 20 (21) B. Schwartz, P. Vicart, C. Delouis and D. Paulin, Mammalian cell lines can be efficiently established *in vitro* upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. Biol. Cell., 72:7 (1991).
- 25 (22) S.K. Nordeen. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. Bio Techniques, 6:454 (1988).

**REVENDICATIONS**

1. Produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un immunovecteur, ledit immunovecteur étant formé d'un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique ou un fragment de cet anticorps conservant cette affinité, ledit produit de couplage étant caractérisé à la fois par la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes du principe biologiquement actif, et par l'affinité de l'immunovecteur pour l'ADN de ces cellules, au point de rendre ledit immunovecteur apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans ces noyaux.  
10
2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le couplage entre le principe biologiquement actif et l'immunovecteur met en oeuvre une liaison covalente ou non-covalente.
3. Produit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'immunovecteur entrant dans la constitution de ce produit est choisi parmi ceux qui sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transféré, suivie, après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin d'une détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur.  
20

4. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'immunovecteur est choisi parmi les IgG monoclonales, les fragments (Fab')<sub>2</sub> ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.
5. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les immunovecteurs sont des IgG porteuses d'activité anti-ADN provenant d'individus normaux.
6. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les immunovecteurs sont des IgG porteuses d'activité anti-ADN provenant  
10 d'individus présentant des syndromes auto-immuns.
7. Produit selon la revendication 6, caractérisé en ce que les immunovecteurs sont des IgG porteuses d'activité anti-ADN provenant d'individus présentant des syndromes de lupus erythémateux disséminé.
8. Produit selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps bi-spécifique reconnaissant d'une part l'ADN et d'autre part une protéine.
9. Produit selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite protéine est choisie parmi les protéines Tat et Rev du rétrovirus VIH.
10. Produit selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce  
20 qu'il s'agit d'un anticorps bi-spécifique reconnaissant d'une part l'ADN et d'autre part un marqueur de surface.
11. Produit selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit marqueur de surface est choisi parmi CD3, CD4, CD8, CD19 et CD34.

12. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le principe actif couplé à l'immunovecteur est une molécule choisie parmi des acides nucléiques, des protéines ou des haptènes.

13. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le principe actif couplé à l'immunovecteur est constitué par un plasmide permettant l'expression d'une protéine codée par un gène contenu dans ledit plasmide.

10 14. Produit selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit immunovecteur est préalablement couplé à un agent capable d'induire un effet de compactage sur l'ADN.

15. Produit selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit agent est la polylysine.

16. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le principe actif est constitué par un gène destiné à s'intégrer dans le génome des cellules cibles.

17. Produit selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit gène est un gène destiné à s'intégrer dans le génome des cellules cibles par recombinaison homologue.

20 18. Produit selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que ledit gène est un ADN "nu" contenant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide originaire de cellules bactériennes ou eucaryotes, de cellules fongiques, ou de virus, ce polypeptide ayant des propriétés vaccinales.

19. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le principe actif permet l'immortalisation de types cellulaires choisis.

20. Produit selon la revendication 19, caractérisé en ce que lesdits types cellulaires sont choisis parmi les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et T, et les cellules hématopoïétiques.

21. Produit selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce que lesdits types cellulaires sont choisis parmi des types cellulaires d'origine humaine.

10 22. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le principe actif est un oligonucléotide antisens permettant l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique.

23. Produit selon la revendication 22, caractérisé en ce que ledit oligonucléotide antisens est un oligonucléotide antisens permettant l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique dans les cellules affectées par un rétrovirus VIH ou dans des cellules tumorales.

20 24. Cellules eucaryotes contenant des molécules actives, caractérisées en ce que lesdites molécules ne sont pas naturellement incorporables aux noyaux desdites cellules, ou ont un taux d'expression faible dans lesdites cellules, lesdites molécules étant présentées dans ces cellules à proximité immédiate de leurs noyaux ou dans ceux-ci, et couplées à un immunovecteur caractérisé par son affinité pour l'ADN de ces cellules, à l'état de produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

25. Cellules eucaryotes selon la revendication 24, caractérisée en ce que lesdites molécules sont des molécules actives au niveau nucléaire.

26. Cellules selon la revendication 24 ou 25, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules infectables par un virus ou de cellules tumorales.

27. Hybridome déposé à la CNCM le 30 juin 1995 sous le numéro d'enregistrement: I-1605, ou I-1606.

28. Procédé de transfert *in vitro* d'un principe actif dans les noyaux de cellules eucaryotes choisies, caractérisé par:

- le couplage de ce principe actif à un immunovecteur, ledit immunovecteur étant un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique ou un fragment de cet anticorps conservant cette affinité, et possédant à la fois la capacité à permettre  
10 l'internalisation de ce principe actif dans ces cellules eucaryotes et une affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transporter ce principe biologiquement actif à proximité immédiate ou dans les noyaux de ces cellules, et
- l'incubation dudit principe actif couplé audit immunovecteur avec lesdites cellules eucaryotes, ledit principe actif couplé audit immunovecteur étant transféré dans le noyau desdites cellules.

29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que le principe biologiquement actif est couplé de façon covalente ou non covalente à l'immunovecteur.

20 30. Procédé selon la revendication 28 ou 29, caractérisé en ce que l'immunovecteur entrant dans la constitution de ce produit est choisi parmi ceux qui sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transporté, suivie après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin d'une

détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur

31. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'immunovecteur est choisi parmi les IgG monoclonales, les fragments (Fab')<sub>2</sub> ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.

10 32. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un produit conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel le principe biologiquement actif est un principe actif de médicament ou de vaccin et l'immunovecteur est compatible avec l'organisme de l'hôte auquel le médicament est destiné.

33. Utilisation du produit selon la revendication 1 pour exprimer *in vitro* dans des cellules réceptrices une séquence nucléotidique hétérologue par rapport à l'ADN de l'hôte.

34. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, pour une utilisation dans le transfert dudit principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux desdites cellules ou dans les noyaux desdites cellules.



FIGURE 1A

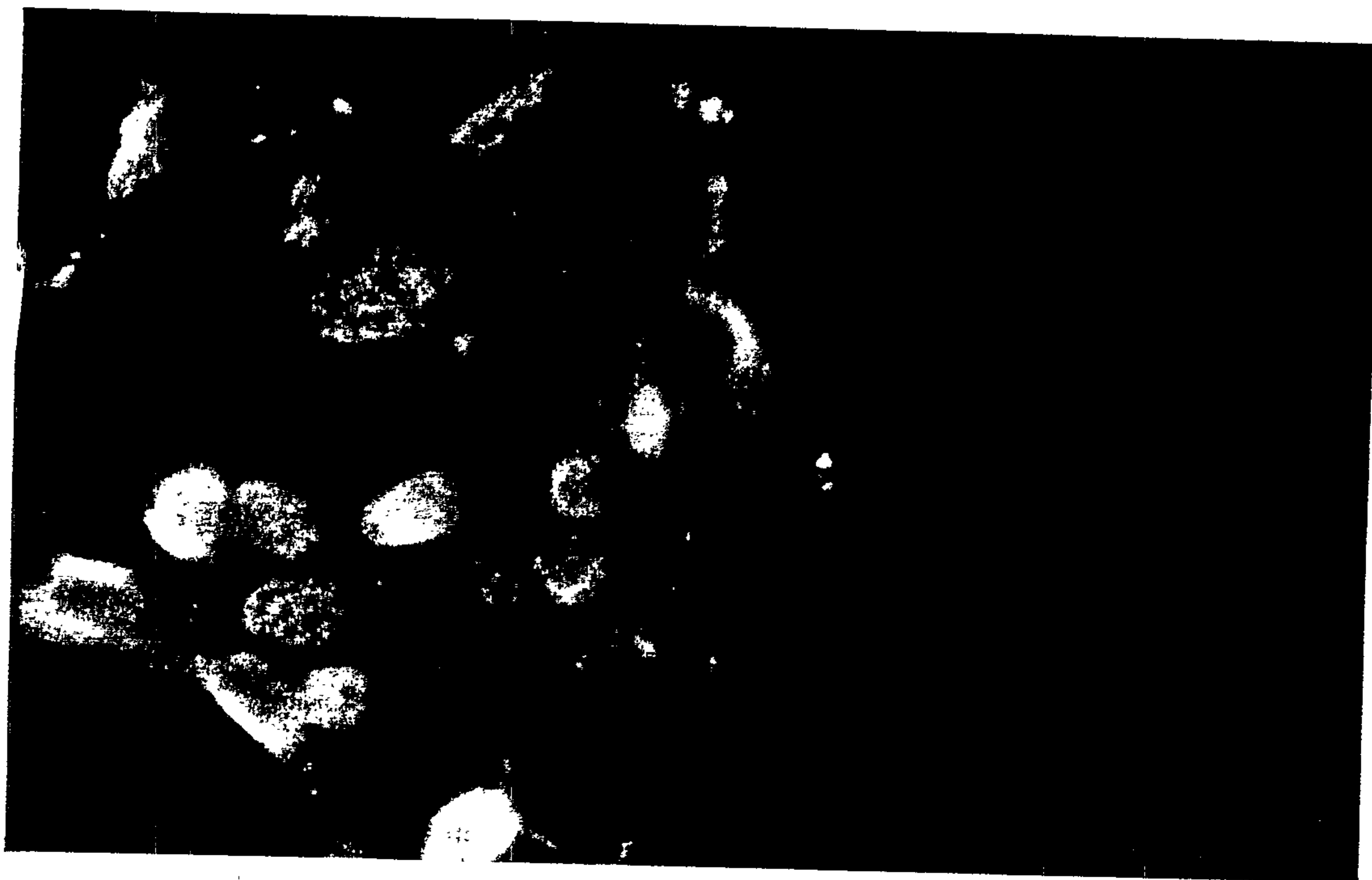


FIGURE 1B

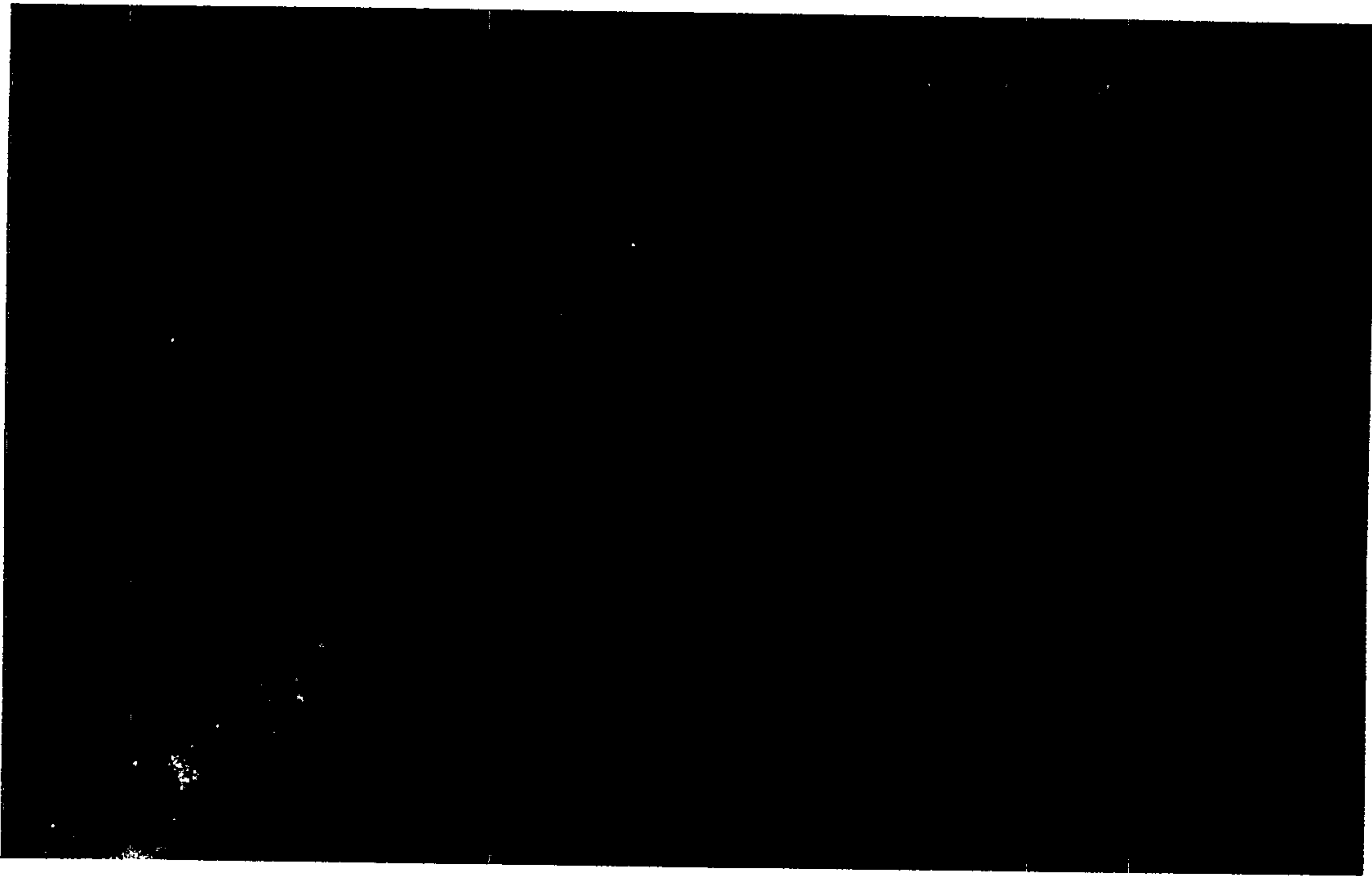


FIGURE 1C

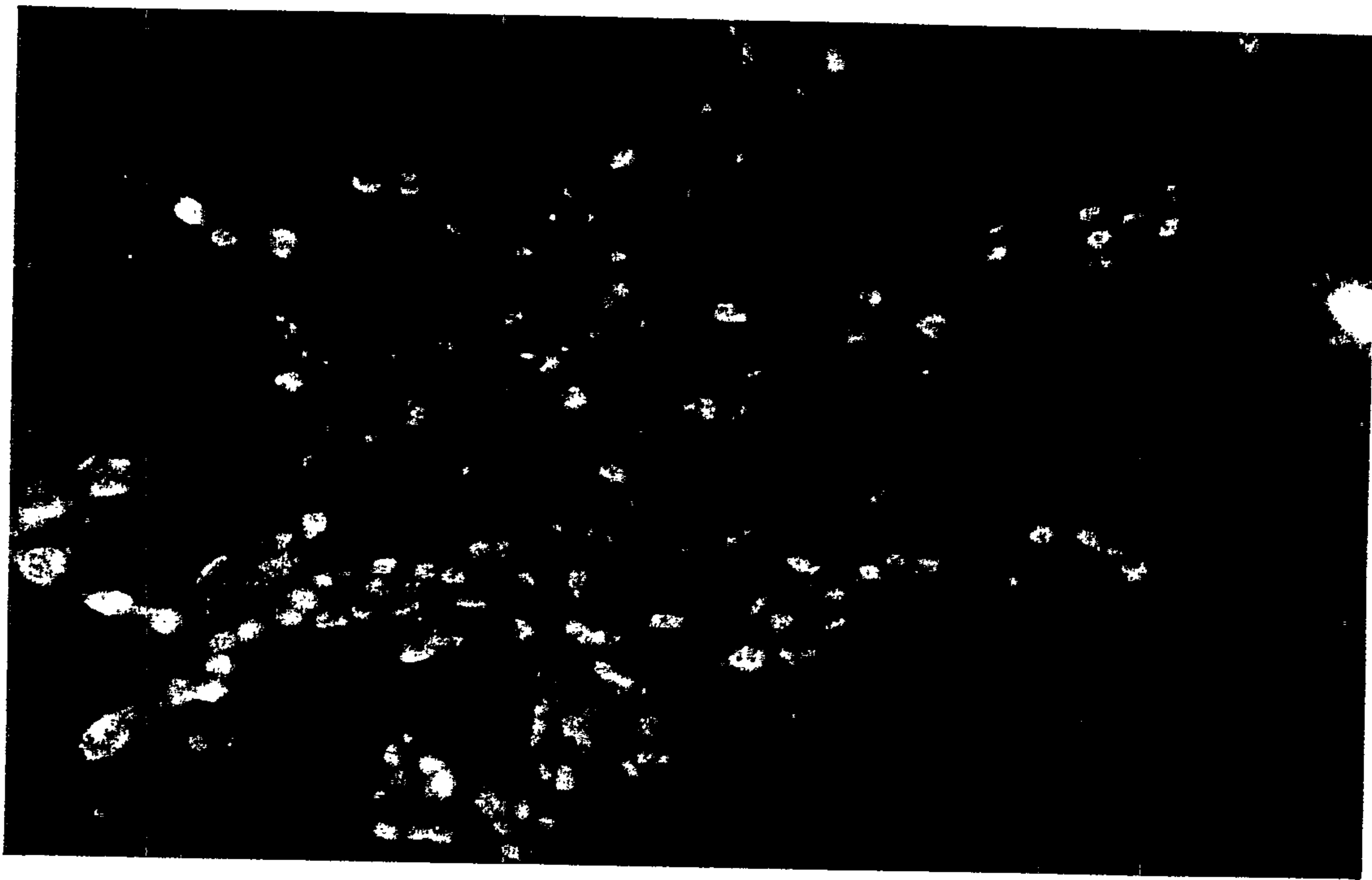


FIGURE 1D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

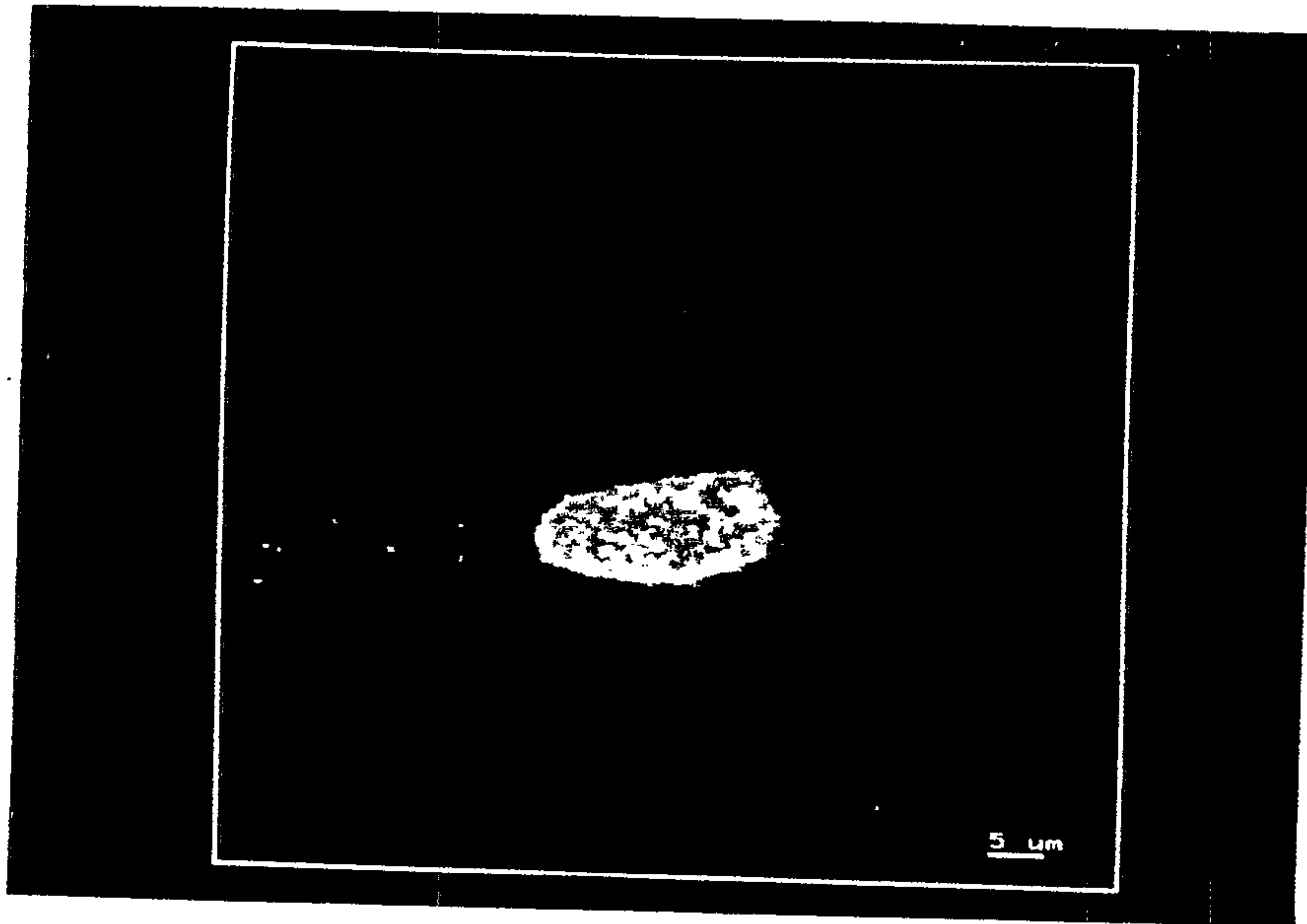


FIGURE 2A

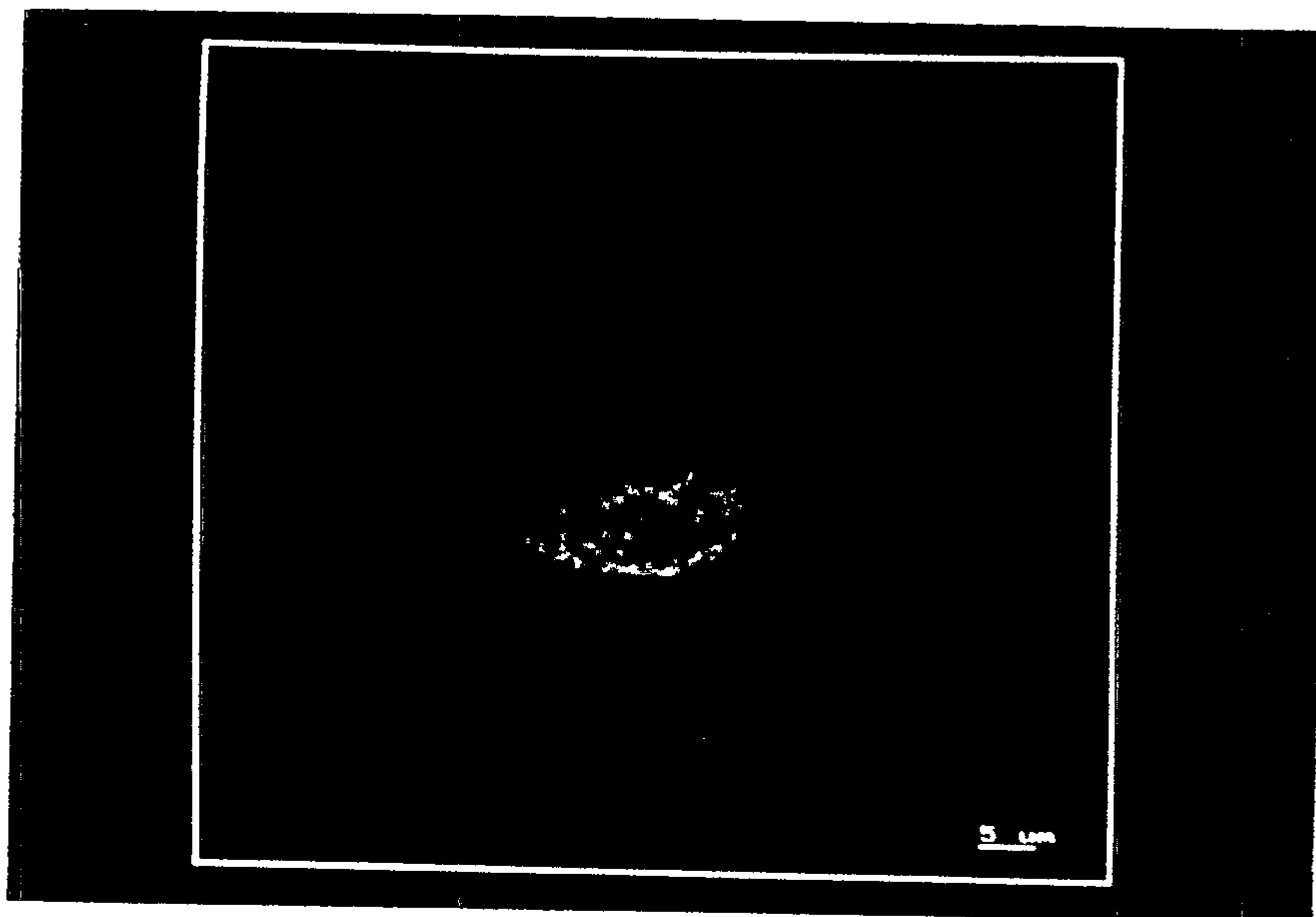


FIGURE 2B

4 / 6

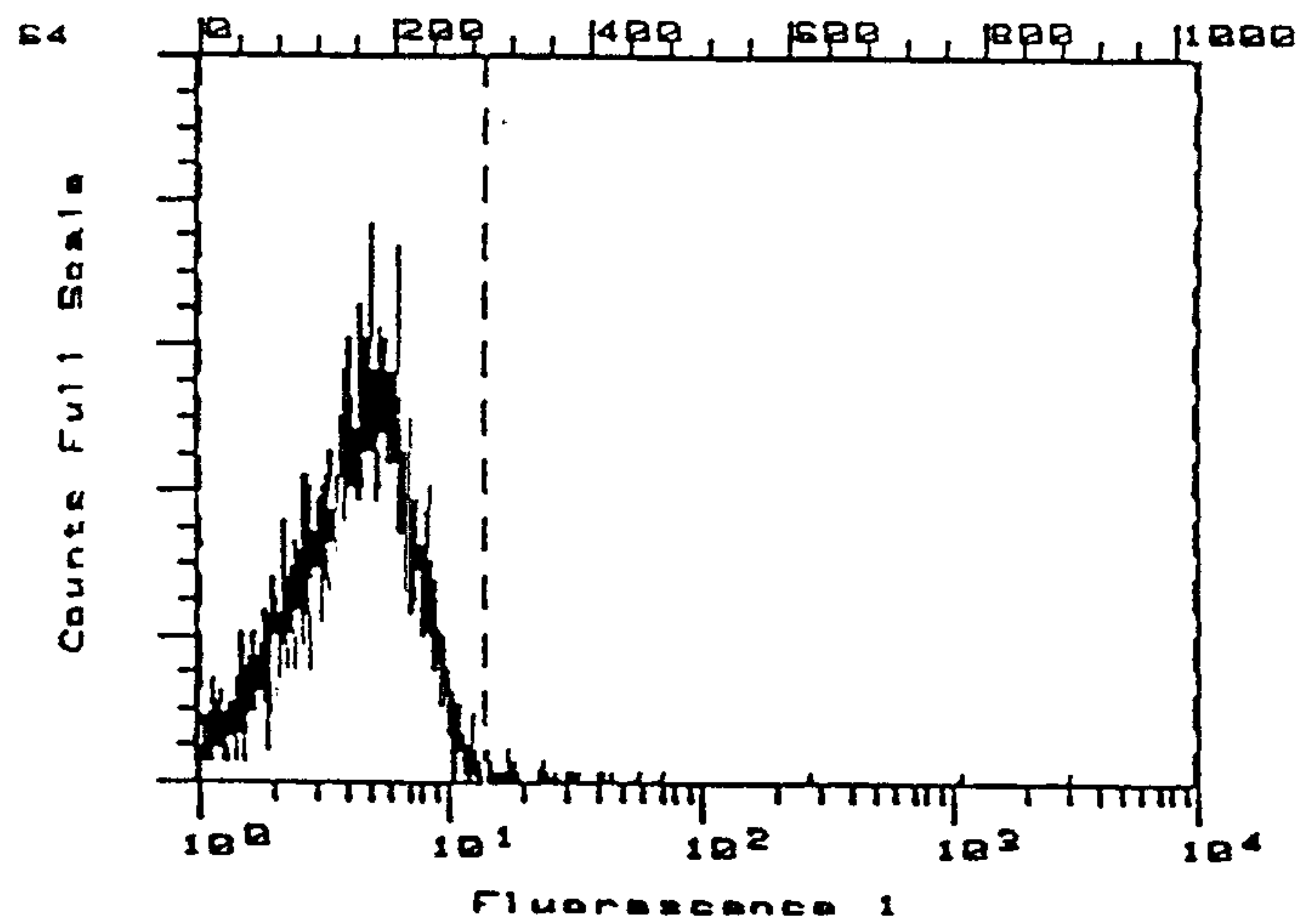


FIGURE 3A

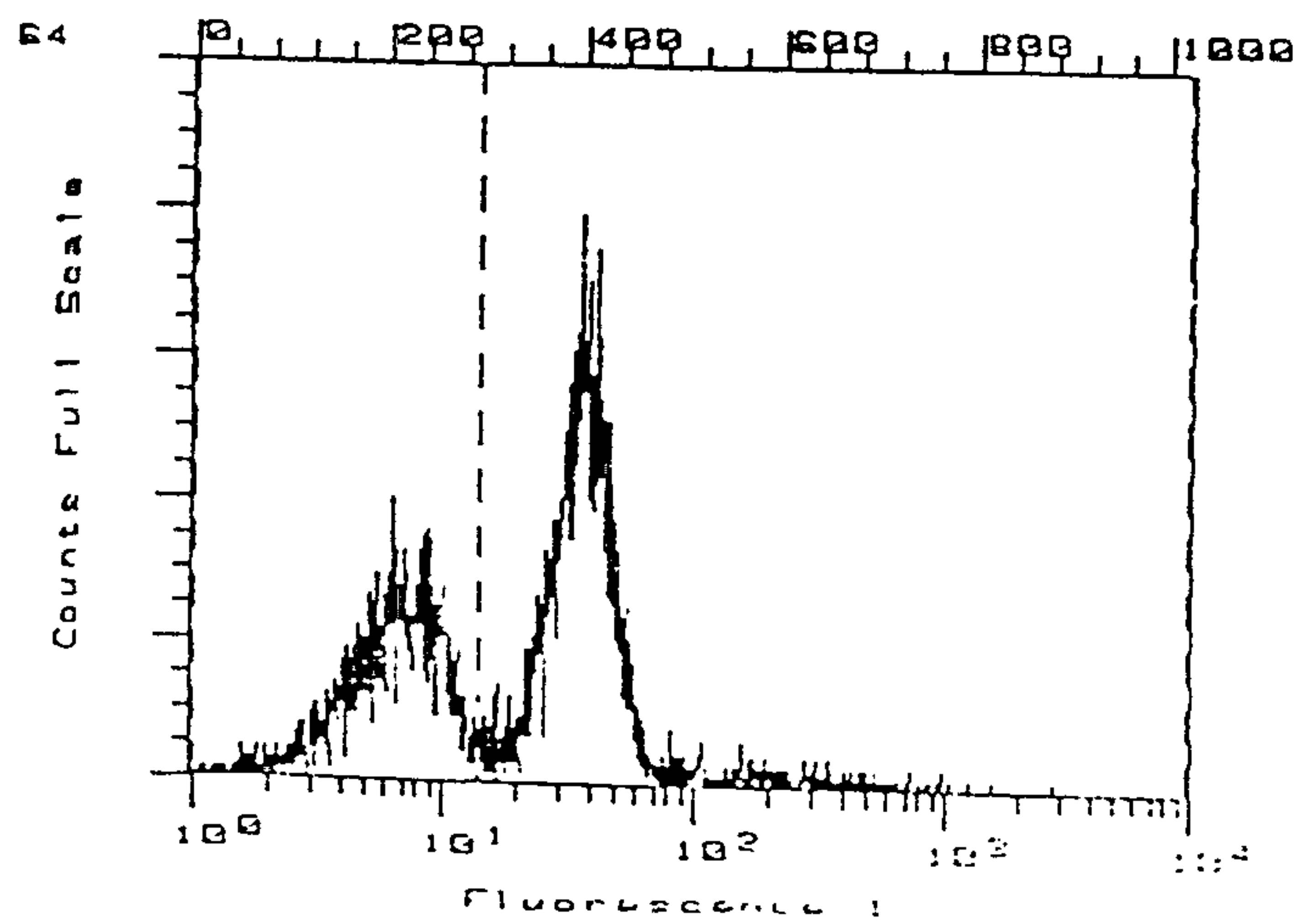


FIGURE 3B

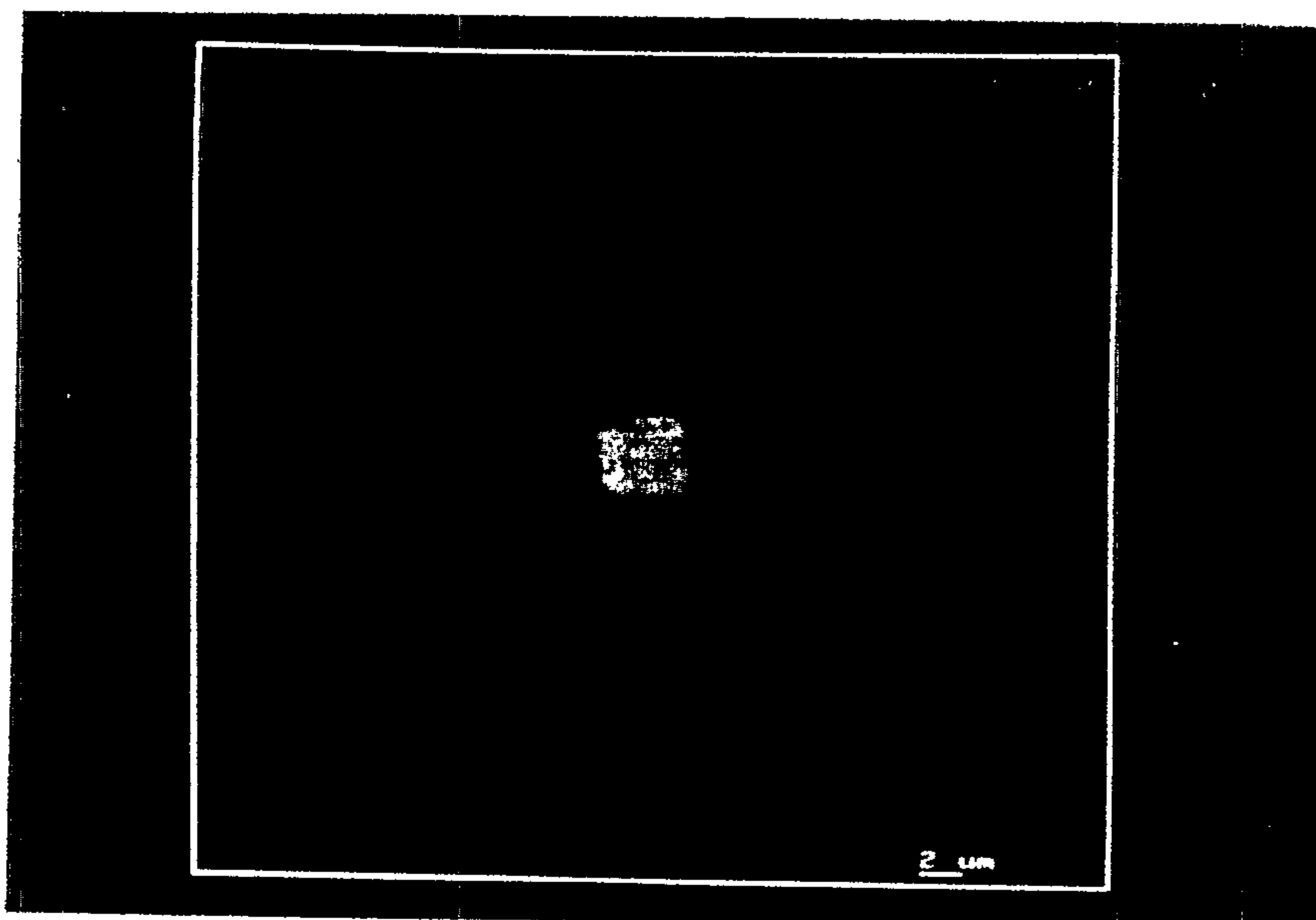


FIGURE 4A

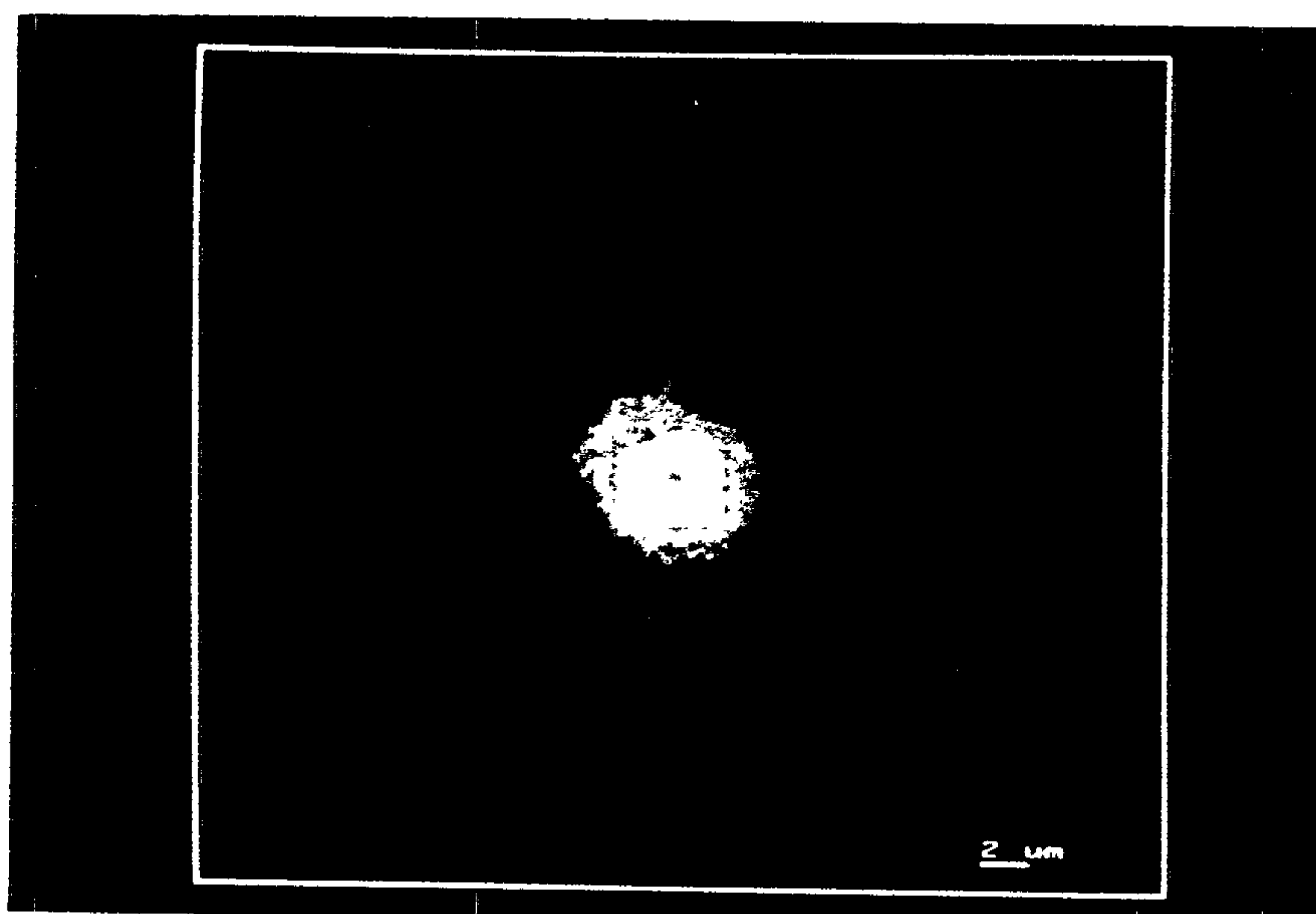


FIGURE 4B

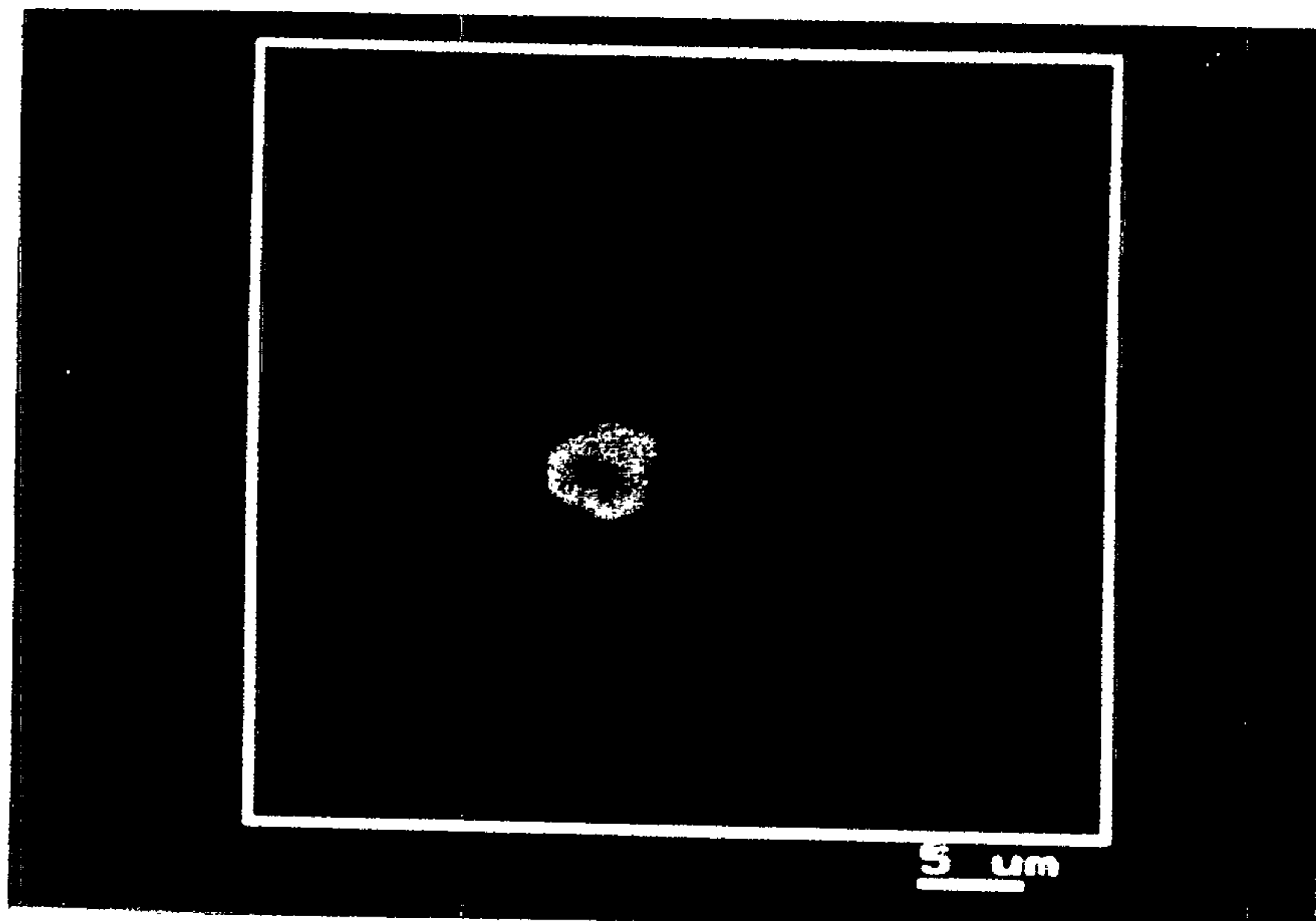


FIGURE 5A

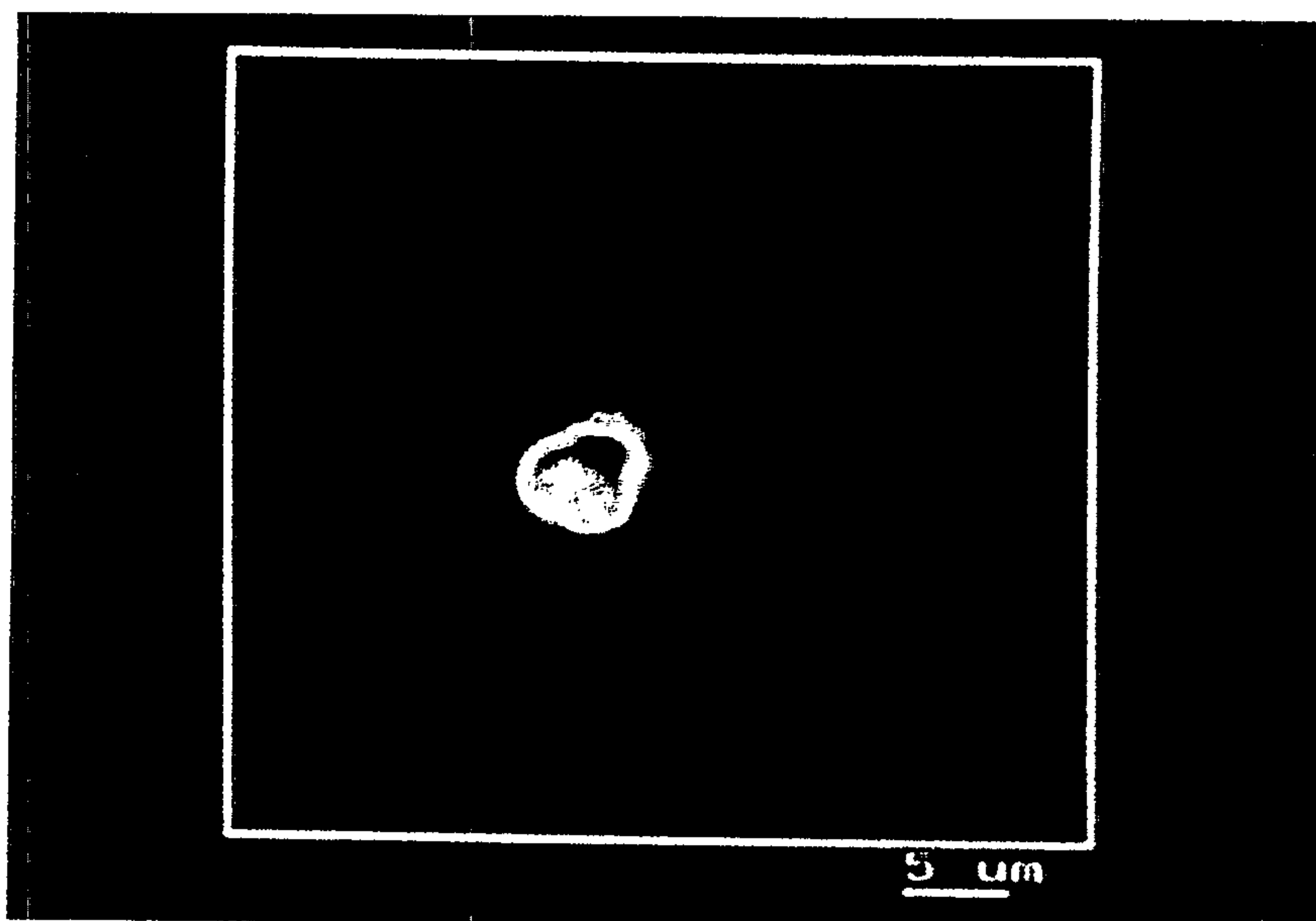


FIGURE 5B