

BREVET D'INVENTION

ROYAUME DE BELGIQUE

SPF ECONOMIE, P.M.E.,
CLASSES MOYENNES & ENERGIE

Office de la Propriété intellectuelle

NUMERO DE PUBLICATION : 1018748A3

NUMERO DE DEPOT : 2009/0286

Classif. Internat. : C12N

Date de délivrance le : 02 Août 2011

Le Ministre pour l'entreprise,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété intellectuelle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 07 Mai 2009 à 16H20 à l'Office de la Propriété Intellectuelle

ARRETE:

**ARTICLE 1.- Il est délivré à : BONE THERAPEUTICS S.A.
Rue Adrienne Bolland 8, B-6041 GOSSELIES(BELGIQUE)**

représenté(e)(s) par : Ann DE CLERCQ, DE CLERCQ & PARTNERS C.V.B.A., Ed. Gevaertdreef 10a - B 9830 ST MARTENS LATEM.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : NOUVELLES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET CELLULES OSTEOGENIQUES .

**INVENTEUR(S) : Badoer Cindy, Alfred Algoetstraat 8, B-1750 Sint-Kwintens-Lennik (BE);
Bastianelli Enrico, Avenue de la Libération 41, B-1640 Rhode-Saint-Genèse (BE);
Pesesse Xavier, Rue de Radoux 98, B-1460 Bierghes (BE)**

PRIORITE(S) 07.05.08 EPEPA081557647

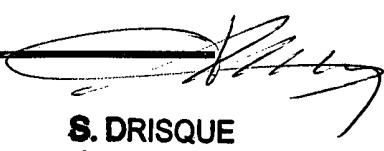
ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Pour expédition certifiée conforme

Bruxelles, le 02 Août 2011
PAR DELEGATION SPECIALE :



DRISQUE S.
Conseiller



S. DRISQUE
Conseiller

.be

NOUVELLES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET CELLULES OSTEOGENIQUES

L'invention concerne d'une manière générale le domaine des phénotypes cellulaires et de
5 la différenciation cellulaire, et les utilisations des cellules en médecine. Plus particulièrement, l'invention concerne un nouveau type de cellules souches mésenchymateuses (MSC) et concerne la différenciation ostéogénique desdites MSC, et les applications thérapeutiques et prophylactiques, dans les maladies osseuses, desdites MSC et de cellules ostéogéniques qui en dérivent.

10 Les inventeurs de la présente invention ont constaté qu'un petit sous-ensemble de cellules MSC isolées et en option amplifiées co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux, tel que par exemple le CD90 ou le CD105, avec le CD34, un marqueur qui est habituellement considéré comme représentant un caractère sanguin et endothérial immature de cellules.

20 Par comparaison avec les populations générales de cellules MSC, ce nouveau type cellulaire exprime des niveaux significatifs de phosphatase alcaline (ALP), un marqueur des ostéocytes, et peut synthétiser et minéraliser une nouvelle matrice osseuse. En conséquence, les cellules possèdent un potentiel relativement élevé de production de cellules ostéogéniques utiles pour la reconstruction osseuse. Les inventeurs ont de même observé que les cellules peuvent être fortement amplifiées, ce en conséquence de quoi des quantités appropriées de cellules ostéogéniques peuvent être produites pour des thérapies à base cellulaire, en particulier pour les troubles osseux. Les inventeurs de la 25 présente invention ont réussi à enrichir les cellules MSC en le sous-type cellulaire ci-dessus, qui alors va conserver ses propriétés phénotypiques et biologiques.

30 Un aspect de l'invention met à disposition une cellule souche mésenchymateuse (MSC) isolée, caractérisée en ce qu'elle co-expime au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.

Un autre aspect met à disposition un procédé pour obtenir des cellules MSC co-expirant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, comprenant (a) l'isolement de cellules MSC à partir d'un échantillon d'un sujet ; (b) en option, l'expansion des cellules 35 MSC de (a) ; et (c) l'isolement, à partir des cellules MSC de (a) ou de (b), d'un sous-

ensemble de cellules qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.

- Un autre aspect concerne des cellules MSC pouvant être obtenues par des étapes
- 5 comprenant (a) l'isolement de cellules MSC à partir d'un échantillon d'un sujet ; (b) en option, l'expansion des cellules MSC de (a) ; et (c) l'isolement, à partir des cellules MSC de (a) ou de (b), d'un sous-ensemble de cellules qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.
- 10 L'invention met aussi à disposition une population cellulaire comprenant les cellules souches mésenchymateuses (MSC) isolées, co-expimentant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, telles que définies dans l'un quelconque des aspects ci-dessus.
- 15 Un autre aspect met à disposition un procédé pour l'expansion *in vitro* de cellules souches mésenchymateuses (MSC) isolées, de préférence de MSC isolées qui expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, comme enseigné dans la présente invention, comprenant l'exposition desdites cellules MSC à un facteur de croissance hématopoïétique et/ou à un facteur de croissance angiogénique, de préférence à un
- 20 facteur de croissance hématopoïétique et à un facteur de croissance angiogénique.

Ce procédé peut aussi être adapté à l'enrichissement, au moyen de conditions de culture appropriées, d'une population de MSC (c'est-à-dire d'une population de MSC relativement plus hétérogène) en des cellules MSC qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34. Cela entraîne l'exposition de ladite population relativement plus hétérogène de MSC (par exemple des cellules MSC isolées de l'échantillon d'un sujet) à un facteur de croissance hématopoïétique et/ou à un facteur de croissance angiogénique, de préférence à un facteur de croissance hématopoïétique et à un facteur de croissance angiogénique.

30 Avantageusement, le procédé peut enrichir une population de cellules MSC initiales ou de démarrage en cellules MSC comprenant l'expression du CD34 et d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux, tels que de préférence le CD105, le CD90 et/ou le CD73. Avantageusement, les cellules MSC en lesquelles ladite population a été enrichie peuvent

35 ne pas présenter d'expression de marqueurs hématopoïétiques et/ou endothéliaux, tels que par exemple le CD45, le CD133, le CD31, le CD14 et/ou le CD19. En conséquence,

dans une forme de réalisation, les cellules MSC en lesquelles la population cellulaire a été enrichie peuvent comprendre l'expression du CD34 et d'un ou plusieurs, de préférence de la totalité des marqueurs CD105, CD90 et CD73, et peuvent ne pas contenir l'expression d'un ou plusieurs, ou de préférence de la totalité des marqueurs CD45, CD133, CD31, 5 CD14 et CD19. Avantageusement, le procédé de la présente invention réalise une augmentation de la proportion de cellules MSC comprenant une co-expression du CD34 et d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux dans une population initiale de MSC au cours de l'application du procédé (par exemple, dans une expérience non limitative, la proportion de cellules MSC CD105-positives et CD34-positives a augmenté, 10 respectivement de 15 à 95 % et de 1 à 59,4 % pendant la culture).

L'invention met aussi à disposition des cellules MSC pouvant être obtenues, ou qui sont directement obtenues par lesdits procédés d'expansion ou d'enrichissement de cellules MSC ou de populations cellulaires par utilisation d'un facteur de croissance 15 hématopoïétique et/ou d'un facteur de croissance angiogénique.

Un autre aspect concerne des procédés pour différencier *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses (MSC) co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 telles que définies dans les aspects précédents, en des cellules ostéogéniques, 20 telles que par exemple les ostéoblastes ou les cellules ostéoprogénitrices.

Un autre aspect met à disposition des cellules ostéogéniques, telles que par exemple des ostéoblastes ou des cellules ostéoprogénitrices, pouvant être obtenues par différenciation *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses (MSC) co-exprimant au moins un 25 marqueur mésenchymateux et le CD34 tels que définis dans les aspects précédents, en des cellules ostéogéniques.

Comme au moins quelques-unes de ces cellules ostéogéniques peuvent conserver le profil d'expression approprié des cellules MSC d'origine, un autre aspect met à disposition 30 des cellules ostéogéniques isolées, tels que par exemple des ostéoblastes ou des cellules ostéoprogénitrices, caractérisées en ce qu'elles co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.

L'invention expose aussi une population cellulaire comprenant des cellules ostéogéniques 35 isolées co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.

L'invention décrit aussi un procédé pour obtenir des cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, comprenant la différenciation, en cellules ostéogéniques, de cellules MSC co-exprimant ledit au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.

5

Ces cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 peuvent aussi être obtenues par d'autres procédés. Ainsi, l'invention décrit aussi un procédé pour obtenir des cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, comprenant (a) l'isolement de cellules ostéogéniques à partir d'un échantillon d'un sujet, ou la différenciation de cellules ostéogéniques à partir de cellules MSC isolées d'un échantillon d'un sujet ; (b) en option, l'expansion des cellules ostéogéniques de (a) ; et (c) l'isolement, à partir des cellules ostéogéniques de (a) ou de (b), d'un sous-ensemble de cellules qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.

15

Un autre aspect met à disposition un procédé pour l'expansion *in vitro* de cellules ostéogéniques isolées, de préférence de cellules ostéogéniques isolées qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 comme enseigné dans la présente invention, comprenant l'exposition desdites cellules ostéogéniques à un facteur de croissance hématopoïétique et/ou à un facteur de croissance angiogénique, de préférence à un facteur de croissance hématopoïétique et à un facteur de croissance angiogénique.

Ce procédé peut aussi être adapté à l'enrichissement, au moyen de conditions appropriées de culture, d'une population de cellules ostéogéniques (c'est-à-dire d'une population de cellules ostéogéniques relativement plus homogène) en des cellules ostéogéniques qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34. Cela entraîne l'exposition de ladite population relativement plus hétérogène de cellules ostéogéniques (c'est-à-dire de cellules ostéogéniques isolées à partir d'un échantillon d'un sujet ou différenciées à partir de cellules MSC isolées d'un échantillon d'un patient) à un facteur de croissance hématopoïétique et/ou à un facteur de croissance angiogénique, de préférence à un facteur de croissance hématopoïétique et à un facteur de croissance angiogénique.

35 Avantageusement, le procédé peut enrichir une population de cellules ostéogéniques initiales ou de démarrage en cellules ostéogéniques comprenant l'expression du CD34 et

- d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux, tels que par exemple le CD105, le CD90 et/ou le CD73. Avantageusement, les cellules ostéogéniques en lesquelles la population a été enrichie peuvent ne pas comporter l'expression de marqueurs hématopoïétiques et/ou endothéliaux, tels que par exemple le CD45, le CD133, le CD31, le CD14 et/ou le CD19.
- 5 En conséquence, dans une forme de réalisation, les cellules ostéogéniques en lesquelles la population a été enrichie peuvent comprendre l'expression du CD34 et d'un ou plusieurs, ou de préférence de la totalité des marqueurs CD105, CD90 et CD73, et peuvent ne pas contenir l'expression d'un ou plusieurs, ou de préférence de la totalité des marqueurs CD45, CD133, CD31, CD14 et CD19. Avantageusement, le procédé de la
- 10 présente invention réalise une augmentation de la proportion des cellules ostéogéniques comprenant une co-expression du CD34 et d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux dans une population de cellules ostéogéniques initiale au cours de l'application du procédé.
- 15 Avantageusement, les cellules ostéogéniques amplifiées et/ou enrichies par exposition à des facteurs de croissance hématopoïétiques et/ou angiogéniques, comme enseigné dans la présente invention, peuvent présenter tant des propriétés ostéogéniques appropriées (par exemple telles que mises en évidence par une expression et une coloration de l'ALP) que des propriétés pro-angiogéniques avantageuses (par exemple
- 20 telles que mises en évidence par l'expression du vWF et du VEGF et/ou par une formation, dans le cadre d'un essai approprié, de structures analogues à des capillaires).

L'invention met aussi à disposition des cellules ostéogéniques pouvant être obtenues, ou que l'on obtient directement, par lesdits procédés d'expansion ou d'enrichissement de

25 cellules ostéogéniques ou de populations cellulaires, par utilisation d'un facteur de croissance hématopoïétique et/ou d'un facteur de croissance angiogénique.

Dans une forme de réalisation, le facteur de croissance hématopoïétique, tel que prévu tout au long de la présente description, est choisi dans un groupe comprenant ou

30 consistant en le facteur de stimulation des colonies 2 (CSF2), le CSF3, le CSF des macrophages (M-CSF), le CSF des granulocytes et des monocytes (GM-CSF), l'interféron (IFN), y compris entre autres l'IFN-gamma, le facteur de nécrose tumorale (TNF) et les cytokines à activité hématopoïétique, telles entre autres que l'interleukine 2 (IL2). De préférence, le facteur de croissance hématopoïétique peut être choisi parmi le GM-CSF et

35 l'IFN-gamma, et plus particulièrement il peut être l'IFN-gamma.

- Dans une forme de réalisation, le facteur de croissance angiogénique, tel que prévu tout au long de la présente description, est choisi dans un groupe comprenant ou consistant en le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), les facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGF1 ou 2), le facteur de von Willebrand (vWF),
- 5 l'angiopoïétine 2, les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF1, FGF-3 ou d'autres facteurs FGF ; ou un facteur FGF autre que le FGF1) et l'érythropoïétine (EPO). Dans une autre forme de réalisation, le facteur de croissance angiogénique peut être choisi dans un groupe comprenant ou consistant en le PDGF, le VEGF, le vWF, l'angiopoïétine 2 et l'EPO. De préférence, le facteur de croissance angiogénique peut être choisi parmi le
- 10 PDGF, le FGF-1 et le FGF-3, il peut être plus particulièrement le PDGF ou le FGF-3 et d'une manière encore plus préférée le PDGF.

De préférence, outre ledit facteur de croissance hématopoïétique et/ou ledit facteur de croissance angiogénique, les cellules MSC ou ostéogéniques peuvent être exposées, de préférence simultanément exposées, au FGF-2 pour stimuler encore plus le maintien, l'expansion, l'enrichissement et/ou la différenciation ostéogénique desdites cellules.

Ainsi, dans une forme de réalisation préférée, l'expansion des cellules MSC ou ostéogéniques, telles que par exemple les cellules MSC ou ostéogéniques comprenant l'expression du CD34 et d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux, comme enseigné dans l'invention, peut comprendre l'exposition desdites cellules MSC ou ostéogéniques à un ou plusieurs facteurs de croissance choisis parmi le GM-CSF, l'IFN-gamma, le PDGF, le FGF-1 et le FGF-3 ; par exemple à un ou plusieurs des facteurs de croissance GM-CSF et IFN-gamma et/ou à un ou plusieurs des facteurs de croissance PDGF, FGF-1 et FGF-3 ; par exemple à un ou plusieurs des facteurs de croissance GM-CSF et IFN-gamma et à un ou plusieurs des facteurs de croissance PDGF, FGF-1 et FGF-3. En option, dans ces formes de réalisation, les cellules peuvent aussi être exposées, de préférence simultanément exposées, au FGF-2. Dans une forme de réalisation particulièrement préférée, l'expansion des cellules MSC ou ostéogéniques, telles que par exemple les cellules MSC ou ostéogéniques comprenant l'expression du CD34 et d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux, comme enseigné dans l'invention, peut comprendre l'exposition desdites cellules MSC ou ostéogéniques à l'IFN-gamma. Ce traitement renforce considérablement les caractéristiques tant ostéogéniques que pro-angiogéniques des cellules ainsi traitées.

Dans une autre forme de réalisation préférée, l'enrichissement en des cellules MSC ou ostéogéniques comprenant l'expression du CD34 et un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux tel qu'enseigné dans l'invention, à partir d'une population initiale de cellules MSC ou ostéogéniques, peut comprendre l'exposition de ladite population initiale
5 de cellules MSC ou ostéogéniques à un ou plusieurs facteurs de croissance choisis parmi le GM-CSF, l'IFN-gamma, le PDGF, le FGF-1 et le FGF-3 ; par exemple à un ou plusieurs des facteurs de croissance GM-CSF et IFN-gamma et/ou à un ou plusieurs des facteurs de croissance PDGF, FGF-1 et FGF-3 ; par exemple à un ou plusieurs des facteurs de croissance GM-CSF et IFN-gamma et à un ou plusieurs des facteurs de croissance PDGF,
10 FGF-1 et FGF-3. En option, dans ces formes de réalisation, les cellules peuvent aussi être exposées, de préférence simultanément exposées, au FGF-2. Dans une forme de réalisation particulièrement préférée, l'enrichissement en des cellules MSC ou ostéogéniques comprenant l'expression du CD34 et d'un ou plusieurs marqueurs mésenchymateux, comme enseigné dans l'invention, à partir d'une population initiale de
15 cellules MSC ou ostéogéniques, peut comprendre l'exposition desdites cellules MSC ou ostéogéniques à l'IFN-gamma. Ce traitement renforce considérablement les caractéristiques tant ostéogéniques que pro-angiogéniques des cellules ainsi traitées.

Un autre aspect met à disposition une composition pharmaceutique comprenant des
20 cellules souches mésenchymateuses (MSC) co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 telles que définies dans les aspects précédents, ou les cellules ostéogéniques telles que définies dans les aspects précédents, telles que les cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, et un ou plusieurs supports/excipients acceptables d'un point de vue pharmaceutique. La
25 composition pharmaceutique peut par ailleurs comprendre une population cellulaire comprenant lesdites cellules MSC ou ostéogéniques, et un ou plusieurs supports/excipients acceptables d'un point de vue pharmaceutique.

Un procédé pour préparer la formulation pharmaceutique est lui aussi mis à disposition, et
30 comprend le mélange des cellules souches mésenchymateuses (MSC) co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 telles que définies dans les aspects précédents, ou des cellules ostéogéniques telles que définies dans les aspects précédents, telles que des cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, ou d'une population cellulaire comprenant lesdites cellules
35 MSC ou ostéogéniques, avec ledit support/excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Les produits cellulaires de l'invention sont particulièrement adaptés à des traitements prophylactiques et thérapeutiques des troubles osseux. Ainsi, d'autres aspects concernent :

5

- les cellules souches mésenchymateuses (MSC) co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 telles que définies dans les aspects précédents, ou les cellules ostéogéniques telles que définies dans les aspects précédents, telles que les cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, ou les populations cellulaires ou compositions pharmaceutiques comprenant les cellules, telles que définies ci-dessus, pour utilisation dans le traitement d'un trouble osseux ;
- 10
- l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 telles que définies dans les aspects précédents, ou les cellules ostéogéniques telles que définies dans les aspects précédents, telles que les cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, ou les populations cellulaires comprenant les cellules telles que définies ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des troubles osseux ;
- 15
- un procédé de traitement d'un trouble osseux chez un sujet ayant besoin d'un tel traitement, comprenant l'administration, audit sujet, d'une quantité à effet thérapeutique ou prophylactique des cellules souches mésenchymateuses (MSC)
- 20
- co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34 telles que définies dans les aspects précédents, ou des cellules ostéogéniques telles que définies dans les aspects précédents, telles que des cellules ostéogéniques co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, ou des populations cellulaires ou compositions pharmaceutiques comprenant les cellules,
- 25
- telles que définies ci-dessus.
- 30

35 L'invention met aussi à disposition un arrangement comprenant un instrument chirurgical adapté à l'administration d'une composition à un sujet, par exemple par voie systémique, ou sur le site d'une lésion osseuse, et comprenant en outre une ou plusieurs quelconques des cellules, populations cellulaires ou compositions pharmaceutiques définies ci-dessus.

Dans certaines formes de réalisation de l'un quelconque des aspects ci-dessus, les cellules (cellules MSC ; cellules ostéogéniques) sont d'origine humaine. De préférence, les MSC peuvent provenir de la moelle osseuse.

- 5 Dans une forme de réalisation préférée, les MSC ou les populations de MSC, telles qu'utilisées dans l'invention, peuvent provenir de la moelle osseuse, et peuvent par exemple être isolées et en option amplifiées à partir d'un échantillon de moelle osseuse. Les MSC et les populations de MSC provenant de la moelle osseuse peuvent avoir des caractéristiques (par exemple profil des marqueurs, fonction, expansion, différenciation, etc.) différentes des MSC provenant d'autres tissus, et/ou plus intéressantes que celles de ces dernières, et notamment, mais sans limitation, peuvent se différencier d'une manière plus efficace et/ou plus régulable en des cellules ostéogéniques.
- 10

- 15 Les cellules MSC présentant le profil de marqueurs ci-dessus peuvent d'une manière représentative présenter aussi d'autres attributs des cellules mésenchymateuses. Par exemple, les cellules MSC peuvent exprimer en outre un, plusieurs, ou la totalité des marqueurs mésenchymateux choisis parmi le CD106 (VCAM), le CD166 (ALCAM), le CD29, le CD44, le CD54 et le GATA-4. Les cellules MSC peuvent en outre présenter certaines caractéristiques morphologiques, telles qu'une ou plusieurs adhérences au 20 plastique de la culture tissulaire ; une croissance en monocouches ; et une forme ovoïde, stellaire ou fusiforme des mononucléaires, avec des noyaux circulaires à ovales, comportant des nucléoles proéminents.

- 25 L'expression "cellules ostéogéniques", telle qu'utilisée dans l'invention, désigne d'une manière générale des cellules capables de contribuer à la formation de matière osseuse et/ou de la matrice osseuse, et en particulier désigne des cellules isolées ou des populations cellulaires qui ont en totalité ou en partie progressé le long d'une voie de différenciation ostéogénique. Sans limitation, les cellules ostéogéniques englobent en particulier les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les ostéocytes et d'autres 30 types cellulaires de la lignée ostéogénique, comme on le sait dans la technique.

- 35 L'homme du métier reconnaît ainsi d'une manière générale les limites de l'expression "cellules ostéogéniques", telles que prévues dans l'invention. Néanmoins, à titre de guide supplémentaire et non de limitation, les cellules ostéogéniques de la présente invention peuvent présenter l'une ou plusieurs quelconques, ou la totalité, des caractéristiques suivantes :

- a) les cellules comprennent l'expression de la phosphatase alcaline (ALP), plus particulièrement de l'ALP des types osseux, hépatiques et rénaux ;
- 5 b) les cellules comprennent l'expression d'une ou plusieurs d'une propeptide amino-terminale du procollagène de type 1 (P1NP), de l'ostéonectine (ON), de l'ostéopontine (OP), de l'ostéocalcine (OCN) et de la sialoprotéine osseuse (BSP) ;
- c) les cellules présentent une preuve de leur aptitude à minéraliser leur environnement externe, ou à synthétiser la matrice extracellulaire contenant du calcium (par exemple quand elle est exposée à un milieu ostéogénique ; voir Jaiswal *et al.*, 1997. *J. Cell Biochem.* 64 : 295-312). L'accumulation de calcium à l'intérieur des cellules, et son dépôt dans les protéines de la matrice, peuvent être traditionnellement mesurées par exemple par culture dans du $^{45}\text{Ca}^{2+}$, lavage et nouvelle culture, puis par détermination d'une éventuelle radioactivité présente à l'intérieur de la cellule ou déposée dans la matrice extracellulaire (US 5 972 703), ou par utilisation d'un essai de minéralisation à base de rouge d'alizarine (voir par exemple Gregory *et al.*, 2004. *Analytical Biochemistry* 329 : 77-84) ;
- 10 15 d) les cellules ne se différencient pas d'une manière considérable en l'une quelconque des cellules de la lignée adipocytique (par exemple les adipocytes) ou de la lignée chondrocytique (par exemple les chondrocytes), et de préférence ne se différencient en aucune de ces dernières. L'absence de différenciation en ces lignées cellulaires peut être testée par utilisation de conditions standard induisant une différenciation, bien établies dans la technique (voir par exemple Pittenger *et al.*, 1999, *Science* 284 : 143-7) et par des méthodes d'analyse (par exemple, après induction, les adipocytes vont d'une manière représentative se colorer à l'oil red O, ce qui met en évidence une accumulation des lipides ; les chondrocytes se colorent habituellement au bleu alcian ou à la safranine O). L'absence presque complète d'une tendance à une différenciation adipogénique et/ou chondrogénique peut habituellement signifier que moins de 50 %, ou moins de 30 %, ou moins de 5 %, ou moins de 1 % des cellules étudiées devraient présenter des signes de différenciation adipogénique ou chondrogénique quand on les applique à l'essai considéré.
- 20 25 30 35

Dans une forme de réalisation, les cellules ostéogéniques peuvent présenter toutes les caractéristiques mentionnées en a), c) et d) ci-dessus.

De préférence, les cellules MSC ou les cellules ostéogéniques, telles que décrites dans
5 l'invention, ou les populations cellulaires qui les comprennent, sont d'origine animale, plus particulièrement proviennent d'un mammifère non humain ou d'un humain, et d'une manière encore plus préférée sont d'origine humaine.

Des cellules MSC co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34, et
10 en option un marqueur additionnel quelconque d'intérêt, telles que décrites dans l'invention, peuvent être obtenues par des procédés qui sont connus en soi.

Par exemple, des procédés classiques permettent d'isoler et en option d'amplifier des cellules MSC ou BMSC à partir d'échantillons biologiques de sujets.
15

Il a été décrit que les MSC ou les BMSC peuvent être isolées et amplifiées à partir de la moelle osseuse ou d'autres sources, par sélection et culture, à partir de ces dernières, de cellules qui peuvent adhérer à une surface formant substrat, en particulier une surface plastique de culture tissulaire. Les protocoles se fondant sur ce principe sont décrits en
20 détail dans Pittenger *et al.*, 1999 (voir ci-dessus) et dans des documents de brevets apparentés mentionnés par ailleurs dans la présente description, et font l'objet d'une vue d'ensemble dans Alhadlaq & Mao 2004 (*Stem Cells Dev.* 13 : 436-48). Ces protocoles sont applicables dans la présente invention.

25 On peut obtenir des cellules ostéogéniques par différenciation à partir de cellules MSC isolées, comme on le sait dans la technique. Dans un exemple, on peut utiliser le procédé de la demande WO 2007/093431, dans lequel des cellules MSC isolées sont cultivées en présence de sérum ou de plasma et d'un facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2) basique. Dans un autre exemple, on peut obtenir des cellules de la lignée ostéogénique
30 par différenciation de cellules MSC dans un milieu ostéogénique, comme décrit par Pittenger *et al.*, 1999 (voir ci-dessus) et Jaiswal *et al.*, 1997 (voir ci-dessus). En option, un milieu ostéogénique traditionnel peut être supplémenté par du FGF-2. Il est de même possible d'isoler et de cultiver directement des cellules ostéogéniques à partir de l'os trabéculaire, comme décrit par Skjodt *et al.*, 1985 (*J. Endocrinol.* 105 : 391-6).

Dans le contexte des différents aspects de l'invention, l'expression "trouble osseux" désigne tout type de maladie osseuse dont le traitement puisse tirer avantage de l'administration de la lignée ostéogénique ou de cellules ostéogéniques, par exemple les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes ou les ostéocytes, à un sujet présentant ce trouble. En particulier, ces troubles peuvent être caractérisés par exemple par une diminution de la formation osseuse ou par une résorption osseuse excessive, par une diminution du nombre, de la viabilité ou de la fonction des ostéoblastes ou des ostéocytes présents dans l'os, par une diminution de la masse osseuse chez un sujet, par un amincissement de l'os, par une diminution de la résistance mécanique ou de l'élasticité de l'os, etc.

A titre d'exemple et non de limitation, l'expression englobe les troubles locaux et systémiques, tels que tout type d'ostéoporose ou d'ostéopénie, par exemple primaire, post-ménopausique, sénile, dû à des corticoïdes, toute ostéonécrose secondaire, monosite ou multisite, tout type de fracture, par exemple une pseudarthrose, un cal vicieux, un retard de consolidation de fracture ou une compression, les conditions exigeant une fusion osseuse (par exemple les spondylodèses et la reconstruction), les fractures maxillo-faciales, la reconstruction osseuse, par exemple après une lésion traumatique ou une intervention chirurgicale en cancérologie, la reconstruction des os crâniaux-faciaux, l'ostéogénèse imparfaite, le cancer ostéolytique des os, la maladie de Paget, les troubles endocrinologiques, l'hypophosphatémie, l'hypocalcémie, l'ostéodystrophie rénale, l'ostéomalacie, les maladies osseuses adynamiques, la polyarthrite rhumatoïde, l'hyperparathyroïdie, l'hyperparathyroïdie primaire, l'hyperparathyroïdie secondaire, la maladie parodontale, la maladie de Gorham-Stout et le syndrome de McCune-Albright.

Les cellules MSC, BMSC et ostéogéniques, et les populations comprenant des cellules de ce type telles que décrites dans l'invention, trouvent différentes utilisations, notamment dans les domaines de la recherche, de la prévention et du traitement des troubles osseux.

Dans un aspect, les cellules ou populations cellulaires peuvent être utilisées pour produire de la matrice osseuse *in vitro*. Cette matrice osseuse peut être utilisée par exemple conjointement aux cellules ou aux populations cellulaires, ou sans ces dernières, dans le traitement de maladies osseuses.

Le traitement peut utiliser des cellules ou des populations de cellules MSC, BMSC ou ostéogéniques, telles que définies dans la présente invention, autologues (c'est-à-dire des cellules dérivées du sujet devant être traité), allogéniques (c'est-à-dire des cellules dérivées d'un ou plusieurs sujets autres que le sujet devant être traité, mais appartenant à 5 la même espèce) ou xénogéniques (c'est-à-dire des cellules dérivées d'un ou plusieurs sujets appartenant à une espèce autre que celle du sujet devant être traité).

Sont envisagés en particulier les traitements de sujets humains par utilisation de cellules ou de populations de cellules MSC, BMSC ou ostéogéniques, telles qu'obtenues dans 10 l'invention, autologues ou allogéniques.

Avantageusement, les cellules et les populations de cellules MSC, BMSC ou ostéogéniques obtenues dans la présente invention peuvent être formulées en des compositions pharmaceutiques et administrées sous forme de compositions 15 pharmaceutiques.

Les compositions pharmaceutiques vont habituellement comprendre les cellules ou les populations de cellules MSC, BMSC ou ostéogéniques de l'invention en tant que principe actif, et un ou plusieurs supports/exciipients acceptables d'un point de vue 20 pharmaceutique.

Dans un autre aspect, l'invention concerne un arrangement comprenant un instrument chirurgical pour administration d'une composition à un sujet, notamment par exemple par voie systémique, topique ou sur le site d'une lésion osseuse, et comprenant en outre les 25 cellules ou populations cellulaires de l'invention, ou une composition pharmaceutique comprenant lesdites cellules ou populations cellulaires, l'arrangement étant adapté à l'administration de la composition pharmaceutique par exemple par voie systémique, topique ou sur le site de la lésion osseuse. Par exemple, un instrument chirurgical approprié peut être capable d'injecter une composition liquide comprenant des cellules de 30 la présente invention, notamment par voie systémique ou sur le site de la lésion osseuse.

Les cellules ou populations cellulaires peuvent être administrées d'une manière qui leur permette de se greffer ou de migrer vers le site tissulaire prévu, en reconstituant ou régénérant la zone fonctionnellement déficiente. L'administration de la composition va 35 dépendre du site musculo-squelettique en cours de réparation. Par exemple, l'ostéogénèse peut être facilitée conformément à une intervention chirurgicale pour

remodeler le tissu ou insérer une fissure, ou un dispositif prothétique tel qu'une prothèse de la hanche.

En d'autres circonstances, une intervention chirurgicale invasive ne sera pas requise, et la

- 5 composition peut être administrée par injection (par exemple pour une réparation de la colonne vertébrale), par utilisation d'un endoscope orientable.

Dans une forme de réalisation, la composition cellulaire pharmaceutique telle que définie ci-dessus peut être administrée sous forme d'une composition liquide. Dans des formes

- 10 de réalisation, les cellules ou la composition pharmaceutique comprenant ces dernières peuvent être administrées par voie systémique, topique, ou sur le site d'une lésion.

Dans une autre forme de réalisation, les cellules ou les populations cellulaires peuvent être transférées sur un substrat approprié et/ou cultivées sur ce substrat, pour prévoir des

- 15 implants. Le substrat sur lequel les cellules peuvent être appliquées et cultivées peut être un métal tel que le titane, un alliage cobalt/chrome ou l'acier inoxydable, une surface bioactive telle qu'un phosphate de calcium, des surfaces polymères telles que le polyéthylène, et analogues. Bien que cela soit moins préféré, on peut aussi utiliser en tant que substrat un matériau siliceux tel que des vitrocéramiques. On préfère tout
20 spécialement les métaux tels que le titane, et les phosphates de calcium, bien que le phosphate de calcium ne soit pas un composant indispensable du substrat. Le substrat peut être poreux ou non poreux.

- Par exemple, les cellules qui ont proliférés, ou qui sont en cours de différenciation dans
25 des boîtes de culture, peuvent si nécessaire être transférées sur des supports solides tridimensionnels dans le but d'être amenées à se multiplier et/ou à poursuivre le processus de différenciation, par incubation du support solide dans un milieu nutritif liquide de l'invention. Les cellules peuvent être transférées sur un support solide tridimensionnel, par exemple par imprégnation dudit support avec une suspension liquide
30 contenant lesdites cellules. Les supports imprégnés obtenus de cette manière peuvent être implantés dans un sujet humain. Ces supports imprégnés peuvent aussi subir une nouvelle culture par immersion dans un milieu de culture liquide, avant implantation finale.

- Le support solide tridimensionnel doit être biocompatible, de façon à pouvoir être implanté
35 dans un humain. Il peut avoir une forme appropriée quelconque, telle qu'une forme de cylindre, de sphère, de plaque, ou d'une pièce de forme arbitraire. Parmi les matériaux

convenant au support solide tridimensionnel biocompatible, une mention particulière peut être faite au carbonate de calcium et en particulier à l'aragonite, notamment sous forme d'un squelette coralien, aux céramiques poreuses à base d'alumine, d'oxyde de zirconium, de phosphate tricalcique et/ou d'hydroxyapatite, à imitation de squelette coralien obtenue 5 par échange hydrothermal, permettant au carbonate de calcium d'être transformé en hydroxyapatite, ou par ailleurs à une vitrocéramique d'apatite-wollastonite, à une vitrocéramique bioactive telle que les verres Bioglass®.

Revendications

1. Cellule souche mésenchymateuse (MSC) isolée, provenant de préférence de la moelle osseuse, caractérisée en ce qu'elle co-exprime au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.
5
2. Cellule MSC isolée selon la revendication 1, dans laquelle l'au moins un marqueur mésenchymateux est choisi parmi le CD105, le CD90 et le CD73.
- 10 3. Cellule MSC isolée selon la revendication 1, qui co-exprime le CD105, le CD90, le CD73 et le CD34.
4. Procédé d'obtention de cellules MSC provenant de préférence de la moelle osseuse, co-exprimant au moins un marqueur mésenchymateux, telles que définies dans
15 l'une quelconque des revendications 1 à 3 et le CD34, comprenant :
 - (a) l'isolement des cellules MSC à partir d'un échantillon d'un sujet ;
 - (b) en option, l'expansion des cellules MSC de (a) ; et
 - (c) l'isolement, à partir des cellules MSC de (a) ou de (b), d'un sous-ensemble de cellules qui co-expriment au moins un marqueur mésenchymateux telles que
20 définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 3, et le CD34.
5. Procédé *in vitro* d'expansion de cellules MSC isolées, de préférence des cellules MSC isolées selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant l'exposition desdites cellules MSC à un facteur de croissance hématopoïétique ou à un
25 facteur de croissance angiogénique, ou tant à un facteur de croissance hématopoïétique qu'à un facteur de croissance angiogénique.
6. Procédé d'enrichissement d'une population de MSC en cellules MSC telles que définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant l'exposition de
30 ladite population de MSC à un facteur de croissance hématopoïétique ou à un facteur de croissance angiogénique ou tant à un facteur de croissance hématopoïétique qu'à un facteur de croissance angiogénique.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, dans lequel le
35 facteur de croissance hématopoïétique est choisi dans un groupe comprenant le facteur de stimulation des colonies 2 (CSF2), le CSF3, le CSF des macrophages (M-CSF), le

- CSF des monocytes et des granulocytes (GM-CSF), l'interféron (IFN), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et les cytokines à activité hématopoïétique, et le facteur de croissance angiogénique est choisi dans un groupe comprenant le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance endothérial vasculaire (VEGF), le 5 facteur de Von Willebrand (vWF), l'angiopoïétine 2, le facteur de croissance des fibroblastes et l'érythropoïétine (EPO).
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, dans lequel le facteur de croissance hématopoïétique est le GM-CSF ou l'IFN-gamma, plus 10 particulièrement l'IFN-gamma, et le facteur de croissance angiogénique est le PDGF, le FGF-1 ou le FGF-3, plus particulièrement le PDGF ou le FGF-3.
9. Cellules MSC isolées pouvant être obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8.
- 15 10. Cellules ostéogéniques pouvant être obtenues par différenciation *in vitro*, en des cellules ostéogéniques, des cellules MSC selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
- 20 11. Cellule ostéogénique isolée, caractérisée en ce qu'elle co-exprime au moins un marqueur mésenchymateux et le CD34.
12. Cellule ostéogénique isolée selon la revendication 11, dans laquelle l'au moins un marqueur mésenchymateux est choisi parmi le CD105, le CD90 et le CD73.
- 25 13. Cellule ostéogénique isolée selon la revendication 11, qui co-exprime le CD105, le CD90, le CD73 et le CD34.
14. Procédé d'expansion *in vitro* de cellules ostéogéniques isolées, de 30 préférence des cellules ostéogéniques isolées selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, comprenant l'exposition desdites cellules ostéogéniques à un facteur de croissance hématopoïétique ou à un facteur de croissance angiogénique ou tant à un facteur de croissance hématopoïétique qu'à un facteur de croissance angiogénique.
- 35 15. Procédé d'enrichissement, en cellules ostéogéniques selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, d'une population de cellules ostéogéniques,

comprenant l'exposition de ladite population de cellules ostéogéniques à un facteur de croissance hématopoïétique ou à un facteur de croissance angiogénique ou tant à un facteur de croissance hématopoïétique qu'à un facteur de croissance angiogénique.

- 5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, dans lequel
le facteur de croissance hématopoïétique est choisi dans un groupe comprenant le facteur
de stimulation des colonies 2 (CSF2), le CSF3, le CSF des macrophages (M-CSF), le
CSF des monocytes et des granulocytes (GM-CSF), l'interféron (IFN), le facteur de
nécrose tumorale (TNF) et les cytokines à activité hématopoïétique, et le facteur de
10 croissance angiogénique est choisi dans un groupe comprenant le facteur de croissance
dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance endothérial vasculaire (VEGF), le
facteur de Von Willebrand (vWF), l'angiopoïétine 2, le facteur de croissance des
fibroblastes et l'érythropoïétine (EPO).
- 15 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, dans lequel
le facteur de croissance hématopoïétique est le GM-CSF ou l'IFN-gamma, plus
particulièrement l'IFN-gamma, et le facteur de croissance angiogénique est le PDGF, le
FGF-1 ou le FGF-3, plus particulièrement le PDGF ou le FGF-3.
- 20 18. Cellules ostéogéniques isolées pouvant être obtenues par le procédé selon
l'une quelconque des revendications 14 à 17.
- 25 19. Cellules MSC isolées selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 9,
ou cellules ostéogéniques isolées selon l'une quelconque des revendications 10 à 13 ou
18, qui sont d'origine humaine.
- 30 20. Population cellulaire comprenant les cellules MSC isolées selon l'une
quelconque des revendications 1 à 3, 9 ou 19 ou les cellules ostéogéniques isolées selon
l'une quelconque des revendications 10 à 13, 18 ou 19.
- 35 21. Cellules MSC isolées selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 9
ou 19, ou cellules ostéogéniques isolées selon l'une quelconque des revendications 10 à
13, 18 ou 19, ou population cellulaire selon la revendication 20, pour utilisation dans le
traitement d'un trouble osseux.

22. Composition pharmaceutique comprenant les cellules MSC isolées selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 9 ou 19, ou les cellules ostéogéniques isolées selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, 18 ou 19, ou la population cellulaire selon la revendication 20, et un ou plusieurs supports/excipients acceptables d'un point de vue pharmaceutique.
- 5
23. Procédé de préparation de la formulation pharmaceutique selon la revendication 22, comprenant le mélange, à un ou plusieurs supports/excipients acceptables d'un point de vue pharmaceutique, des cellules MSC isolées selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 9 ou 19, ou des cellules ostéogéniques isolées selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, 18 ou 19, ou de la population cellulaire selon la revendication 20.
- 10

/

Abrégé descriptif

**NOUVELLES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET CELLULES
OSTEOGENIQUES**

- 5 L'invention concerne un nouveau type de cellules souches mésenchymateuses (MSC) qui co-expiment au moins un marqueur mésenchymateux, de préférence au moins le CD90 ou le CD105, et le CD34. L'invention met aussi à disposition des cellules ostéogéniques ayant un phénotype analogue. L'invention met aussi à disposition les cellules et les populations cellulaires, ainsi que d'autres produits les comprenant, et leur utilisation en
- 10 thérapie osseuse.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLIS EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE BONE-004-BE
Demande nationale belge n° 2009/0286	Date du dépôt	07-05-2009
	Date de priorité revendiquée	
Déposant (Nom) Bone Therapeutics S.A.		
Date de la requête d'une recherche de type international 17-07-2009	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN 52565	
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous) Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB C12N5/08		
II. DOMAINES RECHERCHES Documentation minimale consultée		
Système de classification IPC 8	Symboles de la classification C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés		
III. <input type="checkbox"/> IT A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)		
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)		

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 200900286

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N5/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>YOSHIMURA KOTARO ET AL: "Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates" JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 208, no. 1, juillet 2006 (2006-07), pages 64-76, XP002498508 ISSN: 0021-9541 le document en entier</p> <p>-----</p> <p>WO 2007/093431 A (UNIV BRUXELLES [BE]; EGRIZE DOMINIQUE [BE]; GANGJI VALERIE [BE]; HAUZE) 23 août 2007 (2007-08-23) le document en entier</p> <p>-----</p>	1-10, 19, 20, 22, 23
X		10-23



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



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

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

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

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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

27 octobre 2009

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schwachtgen, J

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 200900286

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007093431	A 23-08-2007	CA 2640794 A1 CN 101384707 A JP 2009526534 T KR 20080109726 A US 2009081169 A1	23-08-2007 11-03-2009 23-07-2009 17-12-2008 26-03-2009



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN52565	Date du dépôt(jour/mois/année) 07.05.2009	Date de priorité (jour/mois/année) 07.05.2008	Demande n° BE200900286
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12N5/08			
Déposant Bone Therapeutics S.A.			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de titre) (Janvier 2007)	Examinateur Schwachtgen, J
---	-------------------------------

OPINION ÉCRITE

Cadre n°1 Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - un listage de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - remis ultérieurement
3. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - un listage de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - remis ultérieurement
3. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Cadre n°V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-23
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-23
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-23
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants :

- D1: YOSHIMURA KOTARO ET AL: "Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates" JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 208, no. 1, juillet 2006 (2006-07), pages 64-76, XP002498508 ISSN: 0021-9541
- D2: WO 2007/093431 A (UNIV BRUXELLES [BE]; EGRISE DOMINIQUE [BE]; GANGJI VALERIE [BE]; HAUZE) 23 août 2007 (2007-08-23)

2. La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet de des revendications 1-23 n'étant pas conforme au critère de nouveauté.

- 2.1 Le document D1 décrit une cellule souche mésenchymateuse isolée, désignée ASC et caractérisée en ce qu'elle coexprime CD34, CD90, CD73 et/ou CD73 (résumé; page 66, colonne de gauche, paragraphe 5; page 69, colonne de gauche, dernier paragraphe; Figure 8). La cellule est capable de différencier le long de la lignée ostéogénique (page 66, colonne de droite, paragraphe 2; page 67, colonne de gauche, paragraphe 4) pour l'utilisation lors de thérapies cellulaires (résumé). Ainsi, D1 anticipe l'objet des revendications 1-10, 19, 20, 22, 23.
- 2.2 Le document D2 décrit une cellule souche mésenchymateuse isolée de la moelle osseuse différenciée en cellule ostéogénique caractérisée en ce qu'elle coexprime CD34, CD90, CD73 et/ou CD73, et exprime ALP (exemples 1 -2). La cellule ostéogénique est utile pour le traitement d'un trouble osseux (exemple 3).Ainsi, D2 anticipe l'objet des revendications 10-23.