(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
24 décembre 2003 (24.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/106665 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] : C12N 7/02, A61K 39/12

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR03/01820

(22) Date de dépôt international : 16 juin 2003 (16.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/07600 18 juin 2002 (18.06.2002) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **BIOMERIEUX** [FR/FR]; Dépt. de la Propriété Industrielle, Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **ANDRE, Patrice** [FR/FR]; 5, rue Servient, F-69003 Lyon (FR). **KOMURIAN-PRADEL, Florence** [FR/FR]; 114, chemin du Pavillon, F-69250 Poleymieux (FR). **LOTTEAU, Vincent** [FR/FR]; 68T, chemin de Balmes, F-69390 Vourles (FR). **PARANHOS-BACCALA, Glaucia** [FR/FR]; 75, cours Gambetta, F-69003 Lyon (FR).

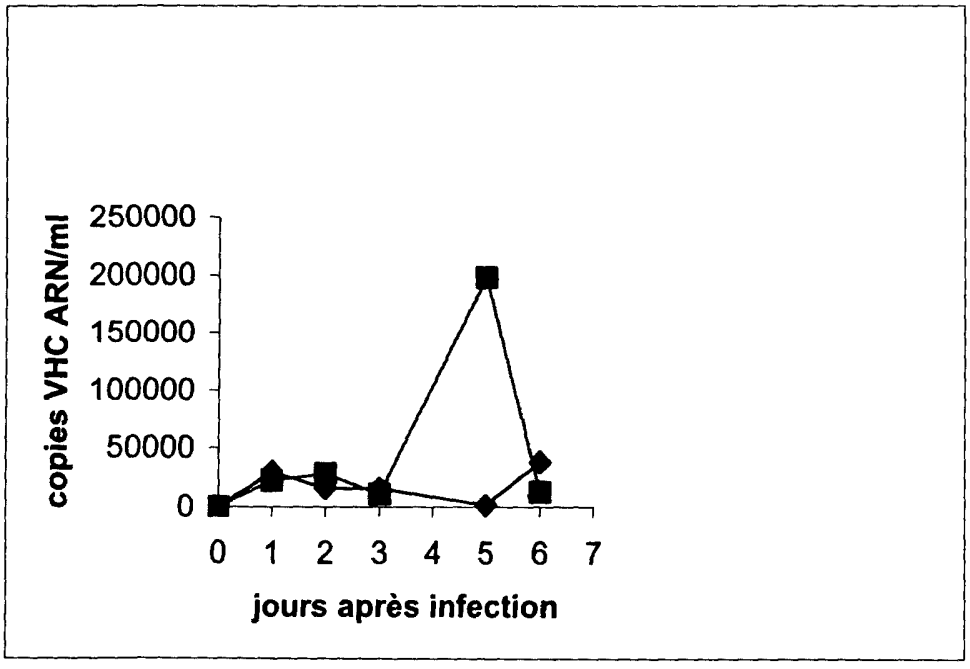
(74) Mandataire : **BITAUD, Valérie**; BioMérieux, Dépt. Propriété Industrielle, Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR CULTURING HVC VIRUS IN VITRO

(54) Titre : PROCEDE DE CULTURE IN VITRO DU VIRUS VHC



(57) Abstract: The invention concerns a method for HVC virus culture *in vitro* comprising steps which consist in: contacting particles containing hepatitis C virus RNA with cells capable of synthesizing and secreting lipoproteins, in a suitable culture environment promoting synthesis and secretion of lipoproteins, and in collecting the virus thus obtained. The invention has diagnostic and therapeutic applications.

[Suite sur la page suivante]

WO 03/106665 A1

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* **:** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de culture *in vitro* du virus VHC comprenant les étapes consistant à mettre en contact des particules contenant l'ARN du virus de l'hépatite C avec des cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines, dans un milieu de culture approprié favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines, et à récolter le virus ainsi obtenu. Applications : diagnostic et thérapeutique.

Procédé de culture in vitro du virus VHC

La présente invention concerne un nouveau procédé de culture *in vitro* du virus de l'hépatite C.

L'hépatite C est la cause principale des hépatites acquises par transfusion. L'hépatite C peut également être transmise par d'autres voies percutanées, par exemple par injection de drogues par voie intraveineuse. Le risque de contamination des professionnels de la santé n'est par ailleurs pas négligeable.

L'hépatite C se distingue des autres formes de maladies du foie associées à des virus, telles que les hépatites A, B ou D. Les infections par le virus de l'hépatite C (VHC) sont souvent chroniques avec pour résultante des maladies du foie, telles que hépatite, cirrhose et carcinome dans un grand nombre de cas.

Bien que le risque de transmission du virus par transfusion ait diminué du fait de la sélection des donneurs de sang, la fréquence des hépatites C reste élevée. Actuellement, environ 170 millions de personnes à travers le monde sont infectées de manière chronique par VHC. Les populations à risque élevé se trouvent principalement chez les transfusés et les utilisateurs de drogues intraveineuses, mais il existe des donneurs de sang asymptomatiques qui n'appartiennent pas à ces groupes à risque élevé et chez lesquels des anticorps anti-VHC circulants ont été retrouvés. Pour ces derniers, la voie de l'infection n'a encore pas été identifiée.

VHC a été le premier virus hépatotrope isolé au moyen des techniques de biologie moléculaire. Les séquences du génome viral ont été clonées sans que les particules virales n'aient été visualisées.

Actuellement, les seules particules virales naturelles caractérisées dans le sang de patients infectés sont des capsides non enveloppées, même si l'on sait que d'autres formes de particules contenant de l'ARN viral existent.

Par commodité, on appellera « virus » dans la présente demande toute particule contenant de l'ARN du virus VHC. On utilisera également les deux termes indifféremment.

VHC est un virus à ARN simple brin positif, d'environ 9,5 kb, qui se réplique par une copie d'ARN complémentaire et dont le produit de la traduction est une polyprotéine unique d'environ 3 000 acides aminés. L'extrémité 5' du génome de VHC

correspond à une région non traduite adjacente aux gènes qui codent pour les protéines structurales, la protéine core de la nucléocapside et les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2. La région non traduite 5' et le gène core sont relativement bien conservés dans les différents génotypes, mais les protéines d'enveloppe E2 sont codées par une région hypervariable différente d'un isolat à un autre isolat. L'extrémité 3' du génome de VHC contient les gènes qui codent pour les protéines non structurales (NS) et pour une région 3' non codante bien conservée.

Du fait de son organisation génomique et de son mode présumé de réplication, VHC a été classifié dans un nouveau genre de la famille des *Flaviviridae,* les hépacivirus.

Le terme virus VHC fait référence à toute espèce virale, parmi lesquelles les souches pathogènes pour l'homme, les souches atténuées et les souches défectives dérivées desdites souches. En effet, il est connu que les virus à ARN présentent un taux de mutations spontanées élevé. Il peut donc exister des souches multiples qui peuvent être plus ou moins virulentes. Il est à la portée de l'homme de l'art d'identifier de telles souches, par exemple par homologie de séquences nucléiques et/ou peptidiques par rapport à une souche de référence et/ou en identifiant une souche ou un isolat par rapport à des critères morphologiques et/ou immunologiques.

De nombreuses techniques ont été développées pour diagnostiquer une infection par VHC. Par exemple, des essais immunologiques de diagnostic ont été réalisés pour détecter des anticorps dirigés contre des protéines de VHC dans les sérums de patients. La synthèse d'ADNc par transcription inverse de l'ARN viral et l'amplification par PCR ont également été utilisées pour détecter le génome de VHC, comme la mesure indirecte d'un virus potentiellement infectieux dans les sérums d'humains infectés de manière chronique ou ceux de chimpanzés infectés expérimentalement. Par ailleurs, sur la base du clonage de gènes, des techniques d'hybridation avec une sonde ADN ont également été développées.

Cependant, il est reconnu que les techniques de diagnostic existantes manquent de sensibilité et/ou de spécificité et/ou souffrent de difficultés de mise en oeuvre. A titre d'exemple, avec la méthode d'hybridation de sondes il est impossible de faire la distinction entre un virus à faible pouvoir infectieux et un virus à pouvoir infectieux

élevé. Il est donc nécessaire, mais difficile à mettre en oeuvre, d'inoculer le virus devant être testé à un chimpanzé et de tester l'infection résultante sur l'animal.

Il est donc de toute première importance, d'un point de vue de santé publique, de pouvoir développer des méthodes spécifiques, sensibles et pratiques pour identifier et cribler les porteurs de VHC. Une des solutions pourrait être de réaliser un système efficace de culture *in vitro* de VHC qui permettrait d'obtenir une propagation du virus, en particulier pour étudier ses mécanismes de réplication, pour tester des anticorps neutralisants ou des antiviraux, de même que pour développer des matériaux biologiques, des essais de diagnostic et des préparations vaccinales. En effet, bien que la séquence complète de VHC soit disponible depuis 1989 (Q. L Choo et al., Science 244, 359 (1989)), la compréhension du cycle de vie et du mode de réplication de VHC a été entravée par manque d'un système de culture *in vitro* approprié. Ito et al. (J. Gen. Virol. 77 : 1043-1054 (1996)) ont bien confirmé le maintien de la réplication de VHC dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, obtenus à partir de patients porteurs de VHC et pour lesquels la maladie était établie de manière chronique, et suggéré un passage d'infection, mais des problèmes relatifs à la propagation du virus subsistent (impossibilité de culture au long cours) et le système développé est limité par la nécessité d'approvisionnement en foie humain et la lourdeur de la technique. Par ailleurs, à ce jour, il n'y a pas de consensus général sur le tropisme de VHC et tous les récepteurs cellulaires pour le virus n'ont pas encore été identifiés.

Dans le plasma de patients infectés par VHC sont retrouvées des particules contenant de l'ARN viral très hétérogènes en densité. Cette hétérogénéité de densité des particules contenant de l'ARN viral est attribuée à leur association en proportion variable avec des lipoprotéines (Thomsen et al., 1993, Med. Microbiol. Immunol. 182 : 639). Dans la description de la présente demande de brevet, les inventeurs ont dénommé ces particules hybrides LVPs (lipo-viro-particules). La répartition de chacune de ces formes le long d'un gradient de densité varie d'un patient à l'autre. Les analyses existantes des particules de faible densité montrent des densités recouvrant celles des LDLs (Low Density Lipoproteins) et des VLDLs (Very Low Density Lipoproteins).

La nature des LVPs contenant de l'ARN viral n'est à ce jour pas précisément connue.

La demande de brevet WO01/09289 décrit un procédé de culture *in vitro* de virus, tels que le VHC, à partir d'au moins une fraction de LVPs obtenue à partir de sérum ou plasma d'un patient infecté, en utilisant des cellules qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et modulée par un agent activateur. Ce procédé s'attache surtout à favoriser l'entrée des fractions dans les cellules en culture. Toutefois, la réplication du virus reste limitée et doit donc être optimisée.

La demande de brevet WO02/10353 décrit des complexes constitués de LVPs associées à des immunoglobulines humaines, de densité inférieure ou égale à 1,063 g/ml, et contenant majoritairement l'ARN du virus HCV, contrairement aux données connues (Hijikata et al., 1993, J. Virol., 1953-1958). En effet, Hijikata et al. ont montré qu'une forte infectivité chez le chimpanzé était retrouvée en présence de particules de densité inférieure à 1,06 g/ml de sorte qu'il ne pouvait pas y avoir d'immunoglobulines humaines, très denses, dans ce type de particules de faible densité. Ces complexes constituent une forme particulière du virus VHC qui est très infectieuse.

Cette demande de brevet décrit également un procédé de culture *in vitro* du virus VHC à partir des complexes LVP/immunoglobuline, en utilisant des cellules comportant à leur surface au moins un type de récepteur du fragment Fc des immunoglobulines ou un type de récepteur ayant la capacité de lier les immunoglobulines. Là-encore, ce procédé favorise l'entrée des complexes dans les cellules de culture mais il ne permet pas une multiplication abondante du virus.

Les présents inventeurs ont maintenant trouvé un nouveau procédé de culture *in vitro* du virus VHC permettant de résoudre l'inconvénient ci-dessus, à savoir qu'il utilise des cellules capables à la fois de faire entrer les particules contenant l'ARN du VHC et d'améliorer assurer la réplication et la production.

En effet, les présents inventeurs ont mis en évidence, de manière surprenante, que les particules d'ARN du VHC appelées LVP :

- sont des particules unitaires globalement sphériques ; ce ne sont donc pas des agglomérats de virions liés à des lipoprotéines normales, comme cela avait été suggéré dans l'art antérieur,

- contiennent des apolipoprotéines B et E et des triglycérides : elles possèdent donc une structure de lipoprotéine, et en particulier de type VLDL ou chylomicron, et
- contiennent la capside et l'ARN du virus : elles se différencient donc des lipoprotéines normales que l'on trouve chez l'homme et constituent une forme non conventionnelle du virus.

Puisque les LVP sont des particules hybrides, à savoir des lipoprotéines contenant des composants viraux, la réplication peut être améliorée de façon inattendue en utilisant des cellules capables de synthétiser les lipoprotéines.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de culture *in vitro* du virus VHC comprenant les étapes consistant à mettre en contact des particules contenant l'ARN du virus de l'hépatite C avec des cellules ayant la capacité de synthétiser et secréter des lipoprotéines, dans un milieu de culture approprié favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines, et à récolter le virus ainsi obtenu.

Par particules contenant l'ARN du VHC, on entend des particules virales, telles que notamment sous forme de complexe LVP/immunoglobuline ou présentes dans le sérum ou le plasma de patients détectés positifs au VHC et contenant de telles particules, et tout inoculum contenant de l'ARN viral, quel que soit le mode de préparation de l'ARN viral dans ledit inoculum.

Les complexes LVP/immunoglobuline et leur procédé de purification à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum d'un patient infecté par VHC, ont déjà été décrits dans la demande de brevet WO02/10353.

Toutefois, ce document ne décrit, ni ne suggère la nature particulière de ces LVP de type lipoprotéine, à savoir qu'ils possèdent des triglycérides, de l'apolipoprotéine B et éventuellement des apolipoprotéines E.

L'apolipoprotéine B est une protéine humaine associée à la membrane du réticulum endoplasmique et qui initie l'assemblage des VLDLs, l'introduction de triglycéride en présence de la protéine de transfert des triglycérides microsomale, ainsi que l'assemblage des VLDL dans la lumière du réticulum endoplasmique. Cette apolipoprotéine est délivrée sous deux formes, apo B 100 et apo B 48, et est synthétisée dans le foie et l'intestin.

L'apolipoprotéine E peut être synthétisée par de nombreuses cellules et notamment par les hépatocytes. Par ailleurs, elle peut être acquise par les VLDLs dans le flux sanguin.

Les cellules utilisées dans le procédé de l'invention sont toutes cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines.

Ces cellules peuvent être soit des cellules primaires, soit des lignées cellulaires.

Le terme lignée cellulaire fait référence aux lignées établies, immortalisées spontanément ou par manipulation. En pratique, pour effectuer une culture virale d'intérêt, il est nécessaire d'avoir des cellules permissives facilement maintenues en culture. La lignée cellulaire est donc de préférence une lignée cellulaire établie ou qui résulte d'une immortalisation par différents procédés. Ceci peut être effectué (i) par l'établissement d'une lignée stable, établie, continue, par mise en co-culture de cellules permissives avec des cellules permissives de même nature tumorisées, capables de se multiplier indéfiniment et d'assurer la propagation du virus au sein de la culture, l'inoculation virale ayant lieu au sein de la culture, (ii) en utilisant des cellules primaires infectées par le virus qui sont ensuite co-cultivées avec des cellules tumorisées permissives qui assurent la propagation du virus au sein de la culture de la lignée cellulaire ainsi établie (iii) par infection virale d'une lignée cellulaire, par exemple une lignée de lymphocytes B immortalisée, par exemple par le virus d'Epstein-Barr ou encore (iv) par modification de l'activité télomérase.

On entend notamment par cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines utilisées dans le procédé de l'invention les cellules ayant spontanément cette capacité et les cellules ayant acquis cette capacité après induction dans un milieu de culture favorisant la différenciation ou redifférenciation des cellules ou après transfection de gènes de synthèse de l'apolipoprotéine apo B et de la protéine microsomale de transfert des triglycérides MTP.

Des exemples de cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines appropriées aux fins de l'invention comprennent les cellules de l'épithélium de l'intestin du type entérocyte, les cellules du cerveau et les cellules du foie.

Selon un mode de réalisation, les cellules utilisées sont des cellules ayant acquis la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines après induction dans un milieu favorisant la différenciation ou redifférenciation des cellules.

En effet, certaines cellules, comme les cellules du foie, ont perdu leur capacité à produire des lipoprotéines ou bien d'autres cellules, comme les cellules de l'épithélium de l'intestin, ont une capacité qui peut être améliorée. Pour pallier cet inconvénient, il est possible d'induire une différenciation ou redifférenciation de ces cellules par mise en contact avec un milieu approprié favorisant cette différenciation ou redifférenciation.

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules appropriées aux fins de l'invention sont les cellules de l'épithélium de l'intestin, et en particulier les cellules Caco-2 (Van Greevenbroeck, M.M.J., et al., 2000, Atherosclerosis, 25-31).

Pour favoriser leur capacité à synthétiser et sécréter des lipoprotéines, les cellules de l'épithélium de l'intestin, telles que Caco-2, peuvent être préalablement cultivées pendant 3 semaines avec un milieu DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, dans des boîtes recouvertes de collagène ou sous des membranes semi-perméables.

A titre d'exemples de cellules du foie, on peut citer les hépatocytes (Moshage, H., et al., 1992, Journal of Hepatology, 15, 404-413) et les hépatocarcinomes tels que les cellules Hep G2 (Gherardi, E., et al., 1992, Journal of Cell Science, 103, 531-539).

Selon un autre mode de réalisation particulier, les cellules utilisées dans le procédé de l'invention sont des cellules d'hépatocarcinome.

Toutefois, dans ce cas, leur capacité à synthétiser et sécréter des lipoprotéines peut être favorisée par mise en contact de ces cellules avec un milieu DMEM modifié, à savoir contenant au moins un agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines. De préférence, ces cellules sont les cellules Hep G2.

A titre d'agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines, on peut citer différents lipides tels que les acides gras, de préférence en C_{18} ou C_{20}, par exemple l'oléate (Luchoomun, J., et al., 1999, The Journal of Biological Chemistry, Vol 274(28), 19565-19572), et les phospholipides tels que la lysophosphatidylcholine (Zhou, Z., 1998, Biochimica et Biophysica Acta, 1391, 13-24).

L'utilisation de l'oléate dans le milieu de redifférenciation des hépatocarcinomes constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le milieu DMEM modifié est constitué, outre par du DMEM (Gibco BRL) et un agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines, d'HEPES 1% (Gibco), de glutamine 1% (Gibco), de gentamycine 0,25 mg/ml (Gibco), d'Ultroser-G 1,5% (Gibco), de Forskoline 5.10^{-6} M (ICN), de PMA $1,6.10^{-7}$ M (4-α-phorbol12-myristate13-acétate) (Sigma), d'acétate de rétinol 5,6 UI/ml (Sigma), de butyrate de sodium $0,5.10^{-3}$ M (Sigma), de niacidamide 10^{-2} M (ICN), de polybrène 2.10^{-6} g/ml (Sigma), de sélénite de sodium $2,9.10^{-8}$ M (ICN) et de triiodo-L-thyronine sodée 1.10^{-9} M (ICN).

Un autre type de cellules utilisable dans le procédé de l'invention consistent en les cellules obtenues après transfection de gènes de synthèse des apolipoprotéines apo B et éventuellement apo E et de la protéine microsomale de transfert des triglycérides. A titre d'exemple de telles cellules, on peut citer des lignées cellulaires d'insecte transfectées telles que décrites par Gretch, D.G., et al. dans The Journal of Biological Biochemistry, 1998, Vol 271(15), 8682-8691.

Les particules contenant l'ARN du VHC, lorsqu'elles sont mises en contact avec les cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines, rentrent dans ces cellules soit par l'intermédiaire des récepteurs des lipoprotéines desdites cellules, du type LDL récepteur, comme dans le cas des LVP par exemple, soit par internalisation par transfection selon les techniques connues de l'homme du métier, comme dans le cas des préparations d'ARN viral par exemple.

Le milieu de culture utilisé dans le procédé de l'invention est tel qu'il favorise la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines, de préférence de type VLDL ou chylomicron.

Un milieu approprié retenu est un milieu DMEM modifié complémenté avec des agents favorisant le métabolisme de la cellule en culture, ainsi qu'avec au moins un agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines.

A titre d'agents favorisant le métabolisme de la cellule, on peut citer le dexaméthasone et l'insuline.

Un milieu DMEM modifié préféré est tel que défini ci-dessus et complémenté avec du dexaméthasone et de l'insuline.

A titre d'agents inducteurs de la synthèse des lipoprotéines, on peut citer différents lipides tels que les acides gras, de préférence en C_{18} ou C_{20}, par exemple l'oléate, les phospholipides tels que la lysophosphatidylcholine, ainsi que le 22 ou 25 OH-cholestérol.

L'utilisation de l'oléate à titre d'agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines, éventuellement en association avec du 22 ou 25 OH-cholestérol, constitue un autre mode de réalisation particulier de l'invention.

Le virus ainsi cultivé par le procédé de l'invention peut être récolté par différents procédés tels que la centrifugation, par exemple sur gradient de densité, et l'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-apo B et/ou anti-apo E.

L'invention concerne également une composition diagnostique comprenant au moins les particules virales obtenues selon le procédé de l'invention ou un de ses composants comme source d'antigène.

L'homme du métier déterminera facilement la quantité de particules virales à utiliser en fonction de la technique diagnostique utilisée.

L'invention concerne encore un procédé pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule antivirale, comprenant l'étape de mise en contact de ladite molécule antivirale dans le milieu de culture pendant le procédé de culture de l'invention.

La sélection des molécules antivirales est effectuée par des techniques bien connues de l'homme du métier telles que la réduction du nombre d'ARN viral intracellulaire et/ou de particules virales infectieuses sécrétées dans le surnageant en présence de concentrations variables des différents inhibiteurs.

Ces inhibiteurs peuvent être des analogues nucléotidiques ou nucléosidiques, des inhibiteurs de protéases virales ou d'autres molécules interférant avec les fonctions des autres protéines virales.

Mais l'invention ouvre également d'autres perspectives thérapeutiques en ce qu'elle permet de développer une composition thérapeutique susceptible d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative la propagation et la réplication *in vivo* du VHC, laquelle est caractérisée en ce qu'elle comprend entre autre un agent susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la synthèse des lipoprotéines, comme par exemple un inhibiteur de la protéine microsomale de transfert des triglycérides.

On entend par agent susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la synthèse des lipoprotéines toute molécule permettant, respectivement, de contrôler, de diminuer ou de supprimer la propagation et la réplication *in vivo* du VHC.

Ces agents peuvent être sélectionnés par criblage à partir d'un pool de molécules ayant une activité pharmacologique reconnue sur les métabolismes des lipides.

On peut citer, à titre d'exemple d'agent susceptible d'inhiber la synthèse des lipoprotéines, l'inhibiteur de la protéine microsomale de transfert des triglycérides.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 3 annexées, sur lesquelles :

- la figure 1 représente un graphe montrant l'influence des conditions de culture (milieu DMEM modifié plus oléate par rapport au milieu standard) des cellules Hep G2 sur la sécrétion des particules virales VHC, sécrétion évaluée par la quantification de l'ARN viral dans le surnageant de culture en fonction du temps,
- la figure 2 représente un graphe montrant l'influence de l'ajout d'oléate dans le milieu de culture DMEM modifié sur la sécrétion des particules virales évaluée par la quantification d'ARN de VHC dans le surnageant de culture en fonction du temps, et
- la figure 3 représente un graphe montrant la production du virus VHC par les cellules Caco-2, après différenciation pendant 3 semaines de culture, ladite production étant mise en évidence par le nombre d'ARN viral dans le surnageant de culture en fonction du temps.

Exemple 1 : Caractérisation des LVP

1.1 Mise en évidence de la forme globalement sphérique des LVP

On a purifié les LVP de sérums de patients détectés positifs pour le virus de l'hépatite C, comme décrit dans la demande de brevet WO02/10353.

On a dilué la fraction de faible densité (LDL) débarrassée des LVP purifiées, ainsi que les LVP purifiées dans du PBS et on les a visualisées à l'aide d'un microscope électronique (appareil JEOL, Centre Commun d'Imagerie de Laennec, Lyon, France) après avoir fait flotter des gouttes de l'échantillon sur des grilles de cuivre de 200 mesh revêtues d'un film support Formvar (Electron Microscopy Science, PA) pendant 3 min

à température ambiante, coloré pendant 3 min par flottaison sur un milieu d'acide photungstique à 4% (masse/vol), tamponné à pH 7,2 avec du NaOH, puis séché.

La fraction LDL était constituée de particules de structure sphérique homogène, d'un diamètre moyen de 25 nm, en accord avec les LDL normales.

En revanche, les LVP purifiées étaient des structures sphériques inhabituellement larges, avec un diamètre moyen de 100 nm.

1.2 Dosage des constituants des LVP

a) Détermination de la concentration en lipides des LVP

On a déterminé les concentrations en cholestérol total, en phospholipide et en triglycéride à l'aide des kits Cholestérol RTU, Phospholipides Enzymatique PAP 150 et Triglycéride Enzymatic PAP 150 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les recommandations du fabricant, et en établissant des courbes standards.

b) Détermination de la concentration en apo B des LVP

On a déterminé la concentration en apolipoprotéine apoB dans les LVP purifiées à l'aide d'un dosage ELISA. Pour ce faire, on a revêtu des plaques ELISA à fond plat, de 96 puits (Maxisorb ; Nunc), avec 100 µl d'anticorps monoclonal anti-apo B humaine (5 µg/ml ; clone 1609 ; Biodesign, Saco, Maine) dans du PBS (solution saline tamponnée au phosphate). On a laissé au repos toute la nuit à 4°C, puis on a bloqué la réaction avec 2% de BSA (sérumalbumine bovine).

On a tout d'abord incubé les échantillons pendant 30 min à la température ambiante dans un mélange PBS- 0,2% de BSA complémenté avec 10 µg d'IgG humaine/ml, puis on les a distribuées sur les plaques à raison de 100 µl/puits.

Après 2 h d'incubation à 37°C et lavage avec un milieu PBS-0,05% de Tween 20, on a ajouté à raison de 100 µl/puits des anticorps de chèvre anti-apo B humaine conjugués à la peroxydase (1,6 µg/ml ; Biodesign) dans un mélange PBS-0,2% de BSA, et on a laissé incubé pendant 90 min à 37°C.

On a lavé les plaques et on a ajouté le substrat o-phénylènediamine (Sigma) à raison de 150 µl/puits. On a laissé le développement de la réaction pendant 10 min et on a lu les plaques à 490 nm.

c) Résultats

Les résultats, en terme de rapport triglycéride/cholestérol (TG/Chol) et triglycéride/apo B (TG/apo B) sont indiqués dans le tableau ci-dessous. A titre de comparaison, ce tableau contient également ces mêmes rapports pour les lipoprotéines normales du patient, c'est-à-dire les lipoprotéines obtenues après extraction des LVP.

Tableau

Densité des fractions	Lipoprotéines normales		LVP purifiées	
	TG/Chol	TG/apo B	TG/Chol	TG/apo B
< 1,006	3,4 ± 1,7	15 ± 1,3[a]	3,1 ± 1,6	160 ± 47[a]
1,025-1,055	0,45 ± 0,2[b]	0,8 ± 0,2[a]	2,8 ± 1,9[b]	26 ± 20[a]

[a] : p≤0,04

[b] : p≤0,01

Les LVP, que l'on retrouve dans les deux fractions de densité différente, à savoir faible et très faible densités, contiennent plus de triglycéride par molécule d'apo B que les lipoprotéines normales des mêmes fractions.

Ces données confirment que :

- les LVP contiennent bien des lipides,
- la concentration en lipides des LVP est différentes de celles des lipoprotéines normales ; cela exclut donc toute contamination, et
- les LVP contiennent de l'apo B.

1.3 Présence d'apoliprotéines B et E

On a mis en évidence la présence d'apo B et d'apo E en empêchant l'entrée des LVP dans des cellules PLC après blocage des sites de liaison aux récepteurs de apoB et apoE desdites cellules comme suit :

On a cultivé 5×10^5 cellules de lignées cellulaires d'hépatome humaines PLC/PFR/5 (ATCC CRL 8024) (Alexander Cells) (Hepatoma humain) dans des plaques de 96 puits (Maxisorb, Nunc ?) pendant 24 h avec un milieu de culture DMEM (Gibco,BRL) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowhittaker,

Emerainville, France), 2mM d'HEPES (Gibco/BRL), 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco/BRL) et 50 UI de pénicilline/streptamycine (Gibco/BRL)/ml à 37°C.

On a bloqué d'une part les sites de liaison au récepteur de l'apo B avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le site de liaison au récepteur de apo B (4G3 et $5^{E}11$; Ottawa Heart Institute Research Corporation, Ottawa, Ontario Canada) et d'autres part les sites de liaison aux récepteurs de l'apo E avec des anticorps monoclonaux 1D7 (Ottawa Heart Institute Research Corporation). On a lavé à trois reprises les cellules de PLC avec du PBS et on les a incubées pendant 3 h avec des LVP purifiées. On a lavé les cellules, puis on les a récoltées dans 350 µl de tampon de lyse du kit Rneasy (Qiagen) et on a extrait l'ARN comme indiqué ci-dessus.

Le blocage de la reconnaissance des LVP en bloquant les sites de reconnaissance des apo B et E indique qu'elles contiennent des apolipoprotéines et met en évidence la structure lipoprotéique des LVP.

1.4 Présence de la capside constituée de la protéine core et de l'ARN du virus dans les LVP

On a mis en évidence la présence de la capside en délipidant les LVP purifiées de la façon suivante : on a incubé les LVP 30 min tout en agitant doucement, dans une solution de 85% d'éther-15% de butanol. On a visualisé la présence de la capside à l'aide d'un microscope électronique (appareil JEOL, Centre Commun d'Imagerie de Laennec, Lyon, France) comme indiqué dans le point 1.1 ci-dessus.

On a confirmé la présence de la protéine core du virus VHC par Western blot par mise en contact des LVP délipidées comme décrit ci-dessus, avec des anticorps monoclonaux anti-protéine core de VHC (19D9D6 ; Jolivet-Reynaud, C. P., et al., 1998, J. Med. Virol., 56, 300-309) et d'anticorps secondaires marqués à l'or 10 nm et visualisation à l'aide des grilles indiquées ci-dessus par immunodétection après coloration négative par flottaison sur de l'acétate d'uranyle à 3%.

Enfin, on a mis en évidence la présence de l'ARN du virus par extraction des LVP purifiées et délipidées en utilisant un kit QIAamp (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France).

Exemple 2 : Influence des conditions de culture sur la production du virus VHC par des cellules Hep G2

On a tout d'abord cultivé des cellules Hep G2 soit dans un milieu constitué de DMEM et de 10% de sérum de veau fœtal (milieu standard), comme dans la demande de brevet WO01/09289, soit dans un milieu DMEM modifié, c'est-à-dire contenant du DMEM complémenté avec de l'HEPES 1%, de la glutamine 1%, de la gentamycine 0,25 mg/ml, de l'Ultroser-G 1,5%, de la Forskoline 5.10^{-6} M, du PMA $1,6.10^{-7}$ M, de l'acétate de rétinol 5,6 UI/ml, du butyrate de sodium $0,5.10^{-3}$ M, du niacidamide 10^{-2} M, du polybrène 2.10^{-6} g/ml, du sélénite de sodium $2,9.10^{-8}$ M et de la triiodo-L-thyronine sodée 1.10^{-9} M.

On a ensuite ensemencé des plaques de culture de 24 puits Falcon à raison de 150 000 cellules par puits avec du milieu standard ou du milieu DMEM modifié et on a laissé en culture pendant 24 h.

On a aspiré le milieu et on a incubé les cellules en présence du virus, à raison de 500 000 ARN VHC par puits, pendant 6h en utilisant du DMEM complémenté avec 0,2% de BSA.

On a ensuite lavé les cellules avec du PBS et on les a cultivées soit en milieu standard, soit en milieu modifié, comme indiqué ci-dessus, mais également complémenté avec de l'hexaméthasone et de l'insuline et un mélange d'oléate et de BSA à raison de 0,15 mM d'oléate.

Toutes les cultures se sont déroulées en atmosphère à 5% de CO_2 et à 37°C.

On a ensuite prélevé le surnageant des puits (en triplicate) et on a quantifié l'ARN VHC par RT-PCR selon le protocole décrit par Komurian-Pradel, F. dans J. Virol. Methods, 2001, 95, 111-119.

Les résultats, copies d'ARN/ml de surnageant en fonction du temps, sont reportés sur la figure 1 sur laquelle les losanges représentent l'utilisation du milieu standard et les carrés l'utilisation du milieu favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines.

Cette figure met en évidence que la réplication du virus et sa sécrétion est améliorée en utilisant des cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines et en les mettant dans des conditions favorables.

Exemple 3 : Importance de l'ajout de lipides dans le milieu favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines

On a tout d'abord cultivé pendant 24 h des cellules Hep G2 dans un milieu modifié tel que décrit dans l'exemple 2 ci-dessus, et on les a ajoutées dans les puits des plaques de culture de 24 puits Falcon à raison de 150 000 cellules par puits.

On a ensuite incubé les cellules en présence du virus, à raison de 400 000 ARN VHC par puits, pendant 6 h dans un milieu DMEM complémenté avec 0,2% de BSA seul ou avec 0,1 µM de 25 OH cholestérol.

On a ensuite lavé les cellules comme indiqué dans l'exemple 2 ci-dessus et on les a cultivées en milieu modifié.

On a ajouté 3 jours après l'inoculation des cellules un mélange oléate-BSA avec 0,15 mM d'oléate.

On a collecté le surnageant et on a quantifié l'ARN VHC par RT-PCR.

Les résultats, mettant en évidence l'importance de l'utilisation d'oléate, sont reportés sur la figure 2 sur laquelle les losanges représentent l'utilisation du milieu modifié seul et les carrés l'utilisation du milieu modifié complémenté avec de l'oléate et du 25 OH cholestérol.

Exemple 4 : Culture du virus à l'aide des cellules Caco-2

Des cellules Caco-2 sont mises à différencier sur des membranes semi-perméables (Transwell, Costar) contenues dans des plaques de 24 puits, pendant 3 semaines en milieu standard (DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal).

On a incubé les cellules ainsi préparées avec les particules virales à raison de 200 000 ARN de VHC/puits pendant 6 h.

On a lavé les cellules et on les a cultivées dans du milieu DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal ainsi que de l'oléate-taurocholate à 0,15 mM d'oléate.

On a prélevé le surnageant au dessus de l'insert et on a quantifié l'ARN viral par RT-PCR.

Les résultats sont reportés sur la figure 3 qui met en évidence la culture du virus VHC par des cellules de l'épithélium de l'intestin dans un milieu favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines.

5

REVENDICATIONS

1. Procédé de culture *in vitro* du virus de l'hépatite C, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à mettre en contact des particules contenant l'ARN du virus de l'hépatite C avec des cellules ayant la capacité de synthétiser et secréter des lipoprotéines, dans un milieu de culture approprié favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines, et à récolter le virus ainsi obtenu.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que les particules contenant l'ARN du virus de l'hépatite C sont les lipo-viro-particules LVP.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les cellules ayant la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines sont choisies parmi les cellules ayant spontanément cette capacité et les cellules ayant acquis cette capacité après induction dans un milieu de culture favorisant la différenciation ou redifférenciation des cellules ou après transfection de gènes de synthèse de l'apolipoprotéine B et de la protéine microsomale de transfert des triglycérides.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les cellules utilisées sont des cellules ayant acquis la capacité de synthétiser et sécréter des lipoprotéines après induction dans un milieu favorisant la différentiation ou redifférenciation des cellules.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules de l'épithélium de l'intestin.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdites cellules sont les cellules Caco-2.

7. Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que les cellules sont préalablement traitées pendant 3 semaines avec un milieu DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules d'hépatocarcinome.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les cellules d'hépatocarcinome sont les cellules Hep G2.

10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que lesdites cellules sont préalablement mises en contact avec un milieu DMEM modifié contenant un agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines est l'oléate.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le milieu favorisant la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines est un milieu dérivé du milieu DMEM modifié, complémenté avec des agents favorisant le métabolisme de la cellule de culture, ainsi qu'avec au moins un agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit milieu comprend l'oléate comme agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit milieu contient également du 22 ou 25 OH-cholestérol comme autre agent inducteur de la synthèse des lipoprotéines.

15. Procédé pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule antivirale, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape de mise en contact de ladite molécule antivirale dans le milieu de culture pendant le procédé de culture selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

16. Composition thérapeutique susceptible d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative la propagation et la réplication *in vivo* du VHC, caractérisée en ce qu'elle comprend entre autre un agent susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la synthèse des lipoprotéines.

FIGURE 1

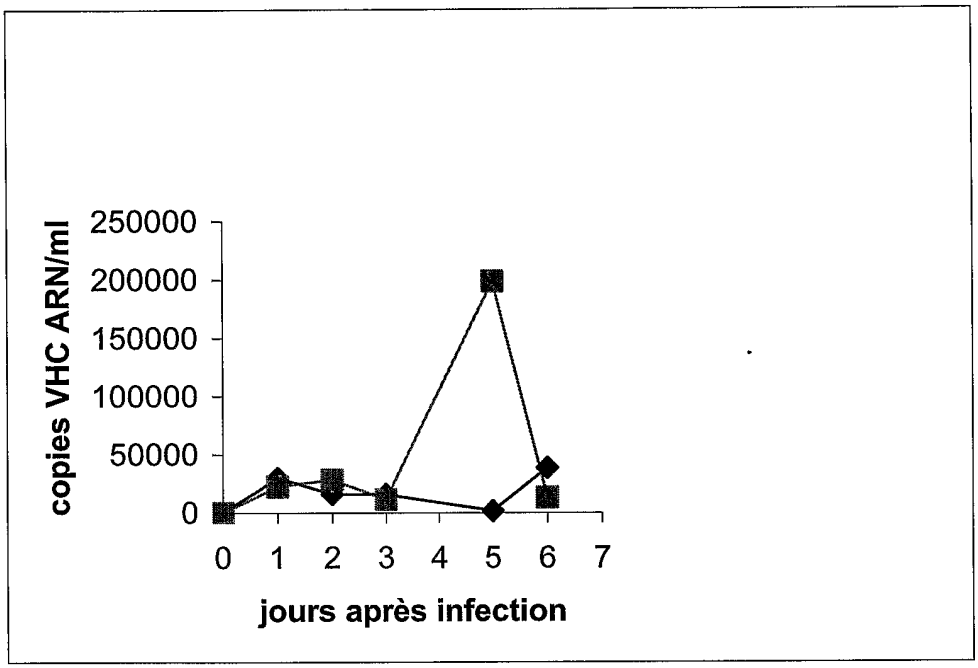

copies VHC ARN/ml
250000
200000
150000
100000
50000
0
0 1 2 3 4 5 6 7
jours après infection

FIGURE 2

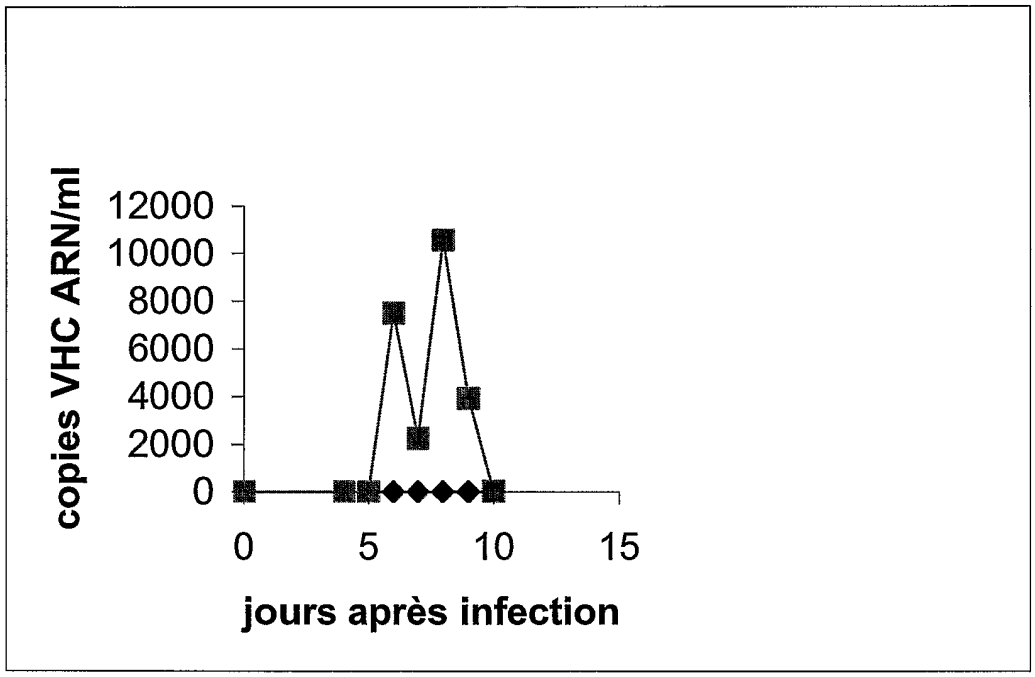
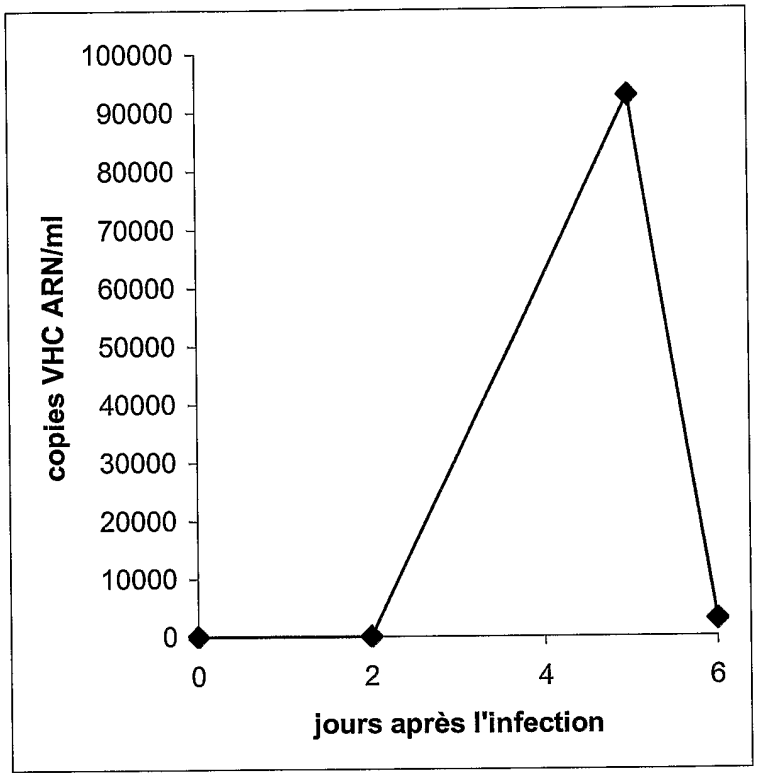

copies VHC ARN/ml
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
5
10
15
jours après infection

FIGURE 3


100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
copies VHC ARN/ml
0
2
4
6
jours après l'infection

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/01820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N7/02 A61K39/12

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 09289 A (INST NAT SANTE RECH MED ;ANDRE PATRICE (FR); BIO MERIEUX (FR); LOT) 8 February 2001 (2001-02-08) cited in the application the whole document page 9, line 9 - line 34 page 11, line 20 - line 31 ---	1-9,12, 13
X	WO 02 10353 A (INST NAT SANTE RECH MED ;ANDRE PATRICE (FR); BIO MERIEUX (FR); LOT) 7 February 2002 (2002-02-07) cited in the application the whole document ---	15,16

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 November 2003	28/11/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Galli, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/01820

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOBERLY ET AL: "Oleic acid stimulation of apolipoprotein B secretion from HepG2 and Caco-2 cells occurs post-transcriptionally" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1, no. 1042, 1990, pages 70-80, XP002073234 ISSN: 0006-3002 the whole document	1-16
A	VAN GREEVENBROEK M.M.J. ET AL.: "Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct density: effect of the ration of unsaturated to saturated fatty acid" ATHEROSCLEROSIS, vol. 149, 2000, pages 25-31, XP002243036 the whole document	1-16
A	LENTZ K.A. ET AL.: "Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system" INT. J. PHARMACEUTICS, vol. 200, 2000, pages 41-51, XP002243037 the whole document	1-16
A	DASHTI N. & WOLFBAUER G.: "Secretion of lipids, apolipoproteins and lipoprotiens by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin" J. LIPID RES., vol. 28, 1987, pages 423-436, XP002243038 the whole document	1-16
T	ANDRÉ P. ET AL.: "Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis RNA-containing particles" J. VIROL., vol. 76, no. 14, July 2002 (2002-07), pages 6919-6928, XP002243035 the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 03/01820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0109289 A	08-02-2001	FR 2796962 A1	02-02-2001
		AU 6847400 A	19-02-2001
		CA 2380407 A1	08-02-2001
		EP 1203076 A1	08-05-2002
		WO 0109289 A1	08-02-2001
		JP 2003506031 T	18-02-2003
WO 0210353 A	07-02-2002	FR 2812304 A1	01-02-2002
		AU 8225101 A	13-02-2002
		EP 1305402 A1	02-05-2003
		WO 0210353 A1	07-02-2002
		US 2002058044 A1	16-05-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 03/01820

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/02 A61K39/12

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)
CIB 7 C12N A61K

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01 09289 A (INST NAT SANTE RECH MED ;ANDRE PATRICE (FR); BIO MERIEUX (FR); LOT) 8 février 2001 (2001-02-08) cité dans la demande le document en entier page 9, ligne 9 - ligne 34 page 11, ligne 20 - ligne 31	1-9,12, 13
X	WO 02 10353 A (INST NAT SANTE RECH MED ;ANDRE PATRICE (FR); BIO MERIEUX (FR); LOT) 7 février 2002 (2002-02-07) cité dans la demande le document en entier	15,16

-/--

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

[X] 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 international 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 international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant 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'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'inven tion 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 internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 novembre 2003	28/11/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Galli, I

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOBERLY ET AL: "Oleic acid stimulation of apolipoprotein B secretion from HepG2 and Caco-2 cells occurs post-transcriptionally" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1, no. 1042, 1990, pages 70-80, XP002073234 ISSN: 0006-3002 le document en entier ---	1-16
A	VAN GREEVENBROEK M.M.J. ET AL.: "Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct density: effect of the ration of unsaturated to saturated fatty acid" ATHEROSCLEROSIS, vol. 149, 2000, pages 25-31, XP002243036 le document en entier ---	1-16
A	LENTZ K.A. ET AL.: "Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system" INT. J. PHARMACEUTICS, vol. 200, 2000, pages 41-51, XP002243037 le document en entier ---	1-16
A	DASHTI N. & WOLFBAUER G.: "Secretion of lipids, apolipoproteins and lipoprotiens by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin" J. LIPID RES., vol. 28, 1987, pages 423-436, XP002243038 le document en entier ---	1-16
T	ANDRÉ P. ET AL.: "Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis RNA-containing particles" J. VIROL., vol. 76, no. 14, juillet 2002 (2002-07), pages 6919-6928, XP002243035 le document en entier -----	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 03/01820

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0109289 A	08-02-2001	FR 2796962 A1	02-02-2001
		AU 6847400 A	19-02-2001
		CA 2380407 A1	08-02-2001
		EP 1203076 A1	08-05-2002
		WO 0109289 A1	08-02-2001
		JP 2003506031 T	18-02-2003
WO 0210353 A	07-02-2002	FR 2812304 A1	01-02-2002
		AU 8225101 A	13-02-2002
		EP 1305402 A1	02-05-2003
		WO 0210353 A1	07-02-2002
		US 2002058044 A1	16-05-2002