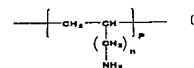
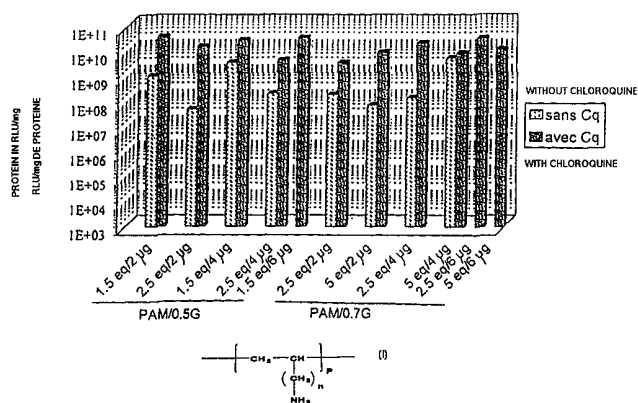




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C08F 8/00, C08G 81/02, A61K 47/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/05183 (43) Date de publication internationale: 4 février 1999 (04.02.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01581 (22) Date de dépôt international: 20 juillet 1998 (20.07.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/09209 21 juillet 1997 (21.07.97) FR 97/15807 12 décembre 1997 (12.12.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KOLBE, Hanno, V., J. [DE/FR]; 6, rue des Tuilliers, F-67204 Achenheim (FR). BOUSSIF, Othmane [MA/FR]; 6, rue de Stockholm, F-67000 Strasbourg (FR). DELAIR, Thierry [FR/FR]; Le Coin, F-69700 Echalas (FR). VERON, Laurent [FR/FR]; 5, rue des Granges, F-69005 Lyon (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: CATIONIC POLYMERS, COMPLEXES ASSOCIATING SAID CATIONIC POLYMERS WITH THERAPEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES COMPRISING AT LEAST A NEGATIVE CHARGE, IN PARTICULAR NUCLEIC ACIDS, AND THEIR USE IN GENE THERAPY		
(54) Titre: POLYMERES CATIONIQUES, COMPLEXES ASSOCIANT LESDITS POLYMERES CATIONIQUES ET DES SUBSTANCES THERAPEUTIQUEMENT ACTIVES COMPRENANT AU MOINS UNE CHARGE NEGATIVE, NOTAMMENT DES ACIDES NUCLEIQUES, ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE		
(57) Abstract The invention concerns novel cationic polymers of formula (I) in which n is a whole number between 0 and 5 and p is a whole number between 2 and 20000, more particularly p ranges between 10 and 18000, and advantageously between 200 and 1000, characterised in that: at least 10 %, advantageously 30 to 80 %, preferably 70 %, of the free NH₂ functions are substituted by identical or different hydrophilic R groups; said cationic polymer can further comprise at least a targeting element associated covalently or not with the free NH₂ functions and/or said hydrophilic R groups provided that said cationic polymer contains at least 20 %, preferably at least 30 %, of free NH₂ functions. The invention also concerns a complex comprising at least said cationic polymer associated with at least a therapeutically active substance, in particular a nucleic acid comprising at least a negative charge. The invention is useful for transferring a nucleic acid into target cells, in particular for gene therapy.		
(57) Abrégé La présente invention concerne des nouveaux polymères cationiques de formule (I) pour lequel n est un nombre entier variant de 0 à 5 et p est un nombre entier variant de 2 à 20000, plus particulièrement p varie de 10 à 18000, et avantageusement de 200 à 1000, caractérisé en ce que: au moins 10 %, avantageusement de 30 à 80 %, préférentiellement 70 %, des fonctions NH₂ libres sont substituées par des groupes R hydrophiles identiques ou différents; ledit polymère cationique peut en outre comprendre au moins un élément de ciblage associé de manière covalente ou non aux fonctions NH₂ libres et/ou auxdits groupes R hydrophiles sous réserve que ledit polymère cationique contienne au moins 20 %, préférentiellement au moins 30 %, de fonctions NH₂ libres. Elle a également pour objet un complexe comprenant au moins un polymère cationique selon l'invention associé à au moins une substance thérapeutiquement active, notamment un acide nucléique comportant au moins une charge négative. Application au transfert d'un acide nucléique dans des cellules cibles, notamment en vue de la thérapie génique.		



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

POLYMERES CATIONIQUES, COMPLEXES ASSOCIANT LESDITS POLYMERES
CATIONIQUES ET DES SUBSTANCES THERAPEUTIQUEMENT ACTIVES
COMPRENANT AU MOINS UNE CHARGE NEGATIVE, NOTAMMENT DES ACIDES
NUCLEIQUES, ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

5 La présente invention concerne de nouveaux polymères cationiques
utilisables pour former des complexes de polymères cationiques et
de substances thérapeutiquement actives comprenant au moins une
charge négative et les complexes correspondants, utiles notamment
pour le transfert d'une substance thérapeutiquement active,
10 notamment un acide nucléique, dans une cellule cible.

Les maladies génétiques s'expliquent en particulier par un
disfonctionnement de l'expression de gènes spécifiques ou par
l'expression de polypeptides mutés non fonctionnels dans au moins
un type cellulaire. La solution thérapeutique qui semble la mieux
15 adaptée à ce type d'affection est de transférer dans des cellules
cibles spécifiques extraites puis réintroduites dans le corps
humain, ou directement dans les organes affectés, l'information
génétique capable de corriger le défaut observé. Il pourra s'agir
par exemple du gène codant pour la protéine CFTR dans le cas de la
20 mucoviscidose ou du gène codant pour la dystrophine dans le cas de
la myopathie de Duchenne. Dans le cadre de cette approche,
également appelée thérapie génique, l'information génétique est
introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe, la
cellule modifiée étant ensuite réintroduite dans l'organisme
25 (procédé *ex vivo*), soit directement *in vivo* dans le tissu
approprié. De nombreuses publications décrivent également la mise
en oeuvre d'un protocole de thérapie génique afin d'obtenir dans
les cellules cibles l'expression d'une protéine présentant un
intérêt thérapeutique par introduction de l'information génétique
30 correspondante. L'intérêt thérapeutique peut par exemple résider
dans la possibilité d'éliminer une tumeur, ou à défaut de retarder
sa progression, par le transfert dans les cellules cancéreuses
cibles de gènes immunostimulateurs (immunothérapie) susceptibles

d'induire ou d'activer une réponse immune à médiation cellulaire à l'égard de la tumeur, ou l'administration de gènes codant pour les cytokines, de gènes cytotoxiques conférant une toxicité aux cellules les exprimant, par exemple le gène tk du virus Herpes Simplex de type 1 (HSV-1), ou d'anti-oncogènes, tels que par exemple le gène associé au rétinoblastome ou p53, ou de polynucléotides capables d'inhiber l'activité d'un oncogène, tels que par exemple les molécules antisens ou les ribozymes capables de dégrader les ARN messagers spécifiques des oncogènes.

10 Au cours des 30 dernières années, plusieurs travaux ont décrit des techniques relatives au transfert de cette information génétique dans des cellules, notamment des cellules de mammifère. Ces différentes techniques peuvent être divisées en deux catégories. La première catégorie concerne les techniques
15 physiques telles que la microinjection, l'électroporation ou le bombardement particulaire qui, bien qu'efficaces, sont largement limitées à des applications *in vitro* et dont la mise en oeuvre est lourde et délicate. La seconde catégorie fait appel à des techniques relatives à la biologie moléculaire et cellulaire pour
20 lesquelles le matériel génétique à transférer est associé à un vecteur de nature biologique ou synthétique qui favorise l'introduction dudit matériel.

Actuellement, les vecteurs les plus efficaces sont des vecteurs viraux, en particulier adénoviraux ou rétroviraux. Les techniques
25 développées reposent sur les propriétés naturelles dont disposent ces virus pour traverser les membranes cellulaires, échapper à la dégradation de leur matériel génétique et faire pénétrer leur génome dans le noyau cellulaire. Ces virus ont déjà fait l'objet de nombreuses études et certains d'entre eux sont d'ores et déjà
30 employés à titre expérimental comme vecteurs de gènes chez l'homme en vue par exemple d'une vaccination, d'une immunothérapie ou

d'une thérapie visant à suppléer une déficience génétique. Toutefois, cette approche virale présente certaines limitations, en particulier liées aux risques de dissémination dans l'organisme hôte et dans l'environnement des particules virales infectieuses produites, au risque de mutagénèse artéfactuel par insertion dans la cellule hôte dans le cas des vecteurs rétroviraux, et à l'induction des réponses immunitaire et inflammatoire *in vivo* lors du traitement thérapeutique. C'est pourquoi des systèmes alternatifs, non viraux de transfert de polynucléotides ont également été développés.

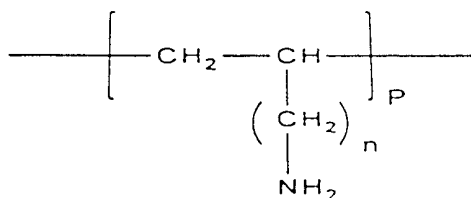
On peut citer par exemple la coprécipitation au phosphate de calcium, l'utilisation de lipides cationiques tels que le DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (Felgner et al., 1987, PNAS, 84, 7413-7417), le DOGS : dioctadecylamidoglycylspermine (Behr et al., 1989, PNAS, 86, 6982-6986 ou Transfectam™), le DMRIE : 1,2-dimiristyl oxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium et le DORIE : 1,2-dioleoyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium (Felgner et al., 1993, Methods 5, 67-75), le DC-CHOL : 3β [N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol (Gao et Huang, 1991, BBRC, 179, 280-285), le DOTAP™ (McLachlan et al., 1995, Gene Therapy, 2, 674-622) ou la Lipofectamine™; ou l'utilisation de polymères couplés à des ligands reconnus par un récepteur membranaire (pour une revue voir Cotten et Wagner, 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4, 705-710).

Cependant, un des problèmes majeurs rencontrés lorsque l'on souhaite transférer des gènes dans des cellules cibles, réside dans la difficulté de faire pénétrer les acides nucléiques en raison notamment de leur nature polyanionique qui prévient leur passage à travers les membranes cellulaires. L'utilisation de polymères cationiques pouvant s'associer aux acides nucléiques par

liaisons électrostatiques permet de résoudre ce problème au moins partiellement. Ainsi le document WO 95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO 96/02655, l'utilisation de polyéthylène imine, ou de polypropylène imine et les documents
 5 US-A- 5 595 897 et FR 2 719 316, l'utilisation de conjugués de polylysine.

Le déposant a aujourd'hui identifié de nouveaux polymères cationiques possédant des propriétés particulièrement avantageuses pour le transfert dans les cellules de substances
 10 thérapeutiquement actives comportant des charges négatives, notamment des acides nucléiques. En outre, ces polymères présentent l'avantage d'être facilement accessibles, notamment par synthèse chimique et peu coûteux. Ils sont très faiblement toxiques à l'égard des cellules ce qui constitue un avantage
 15 considérable dans le domaine de la thérapie génique.

La présente invention concerne tout d'abord un polymère cationique de formule I :



20

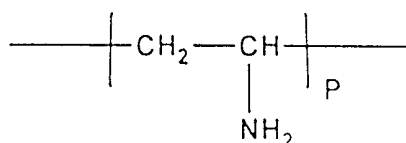
dans laquelle n est un nombre entier variant de 0 à 5 et p est un nombre entier variant de 2 à 20000, plus particulièrement p varie de 10 à 18000, et avantageusement de 200 à 1000

caractérisé en ce que :

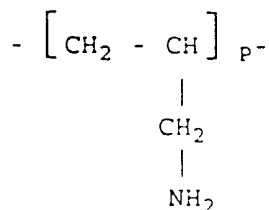
- 25
- au moins 10%, avantageusement de 30 à 80%, préférentiellement 70%, des fonctions NH₂ libres sont substituées par des groupes R hydrophiles, identiques ou différents ;
 - ledit polymère cationique peut en outre comprendre au moins

un élément de ciblage associé de manière covalente ou non aux fonctions NH_2 libres et/ou auxdits groupes R hydrophiles sous réserve que ledit polymère cationique contienne au moins 20%, préférentiellement au moins 30%, de fonctions NH_2 libres.

5 L'invention concerne plus particulièrement un polymère cationique défini par la formule II suivante :



10 Avantageusement, ledit polymère cationique est défini par la formule III :



15 Les polymères de formule II et III présentent les caractéristiques telles que définies préalablement pour le polymère de formule plus générale I.

Selon la présente invention, par "groupe hydrophile" on entend désigner un groupe comportant au moins une fonction hydrophile. Il
25 peut s'agir par exemple d'une fonction hydrophile choisie parmi les fonctions, amine, hydroxyle, amide et ester.

Ces fonctions hydrophiles peuvent être directement associées aux fonctions NH_2 libres du polymère par une liaison N-C, ou indirectement par l'intermédiaire d'un bras. Dans ce dernier cas,

l'invention concerne par exemple un polymère cationique pour lequel R est choisi parmi les groupes :

$R'-C = O$, et ;

$-(CH_2)_n-R'$

5 où R' désigne un groupement contenant au moins une fonction hydrophile et n' est un nombre entier variant de 1 à 5.

Selon un mode de réalisation avantageux, le groupe hydrophile R ou R' consiste en un polymère présentant des propriétés hydrophiles, tel que par exemple le polyéthylène glycol (PEG) ou
10 ses dérivés, par exemple un méthoxy-PEG, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthyloxazoline, le polyéthyloxazoline, le polyhydroxypropyl methacrylamide, l'acide polylactique, l'acide polyglycolique et les dérivés de celluloses tels que l'hydroxyméthylcellulose ou l'hydroxyéthylcellulose. Selon
15 l'invention, le poids moléculaire de tels polymères varie de préférence de 300 à 5000, plus particulièrement de 1000 à 4000, et est avantageusement de 2000. Le polymère préféré pour la mise en oeuvre d'une telle variante de l'invention est le polyéthylène glycol (PEG) et plus particulièrement le PEG 2000.

20 D'une manière générale, lorsque n et/ou n' sont supérieurs à 5, la solubilité du polymère cationique ainsi formé ou sa capacité à former des interactions stables avec une molécule chargée négativement peuvent être perturbées. Néanmoins, il est à la portée de l'homme du métier d'analyser les propriétés de telles
25 structures et de déterminer par expérimentations les conditions les plus favorables pour l'utilisation de tels polymères, notamment pour la complexation avec des acides nucléiques et pour la transfection de cellules.

Des exemples représentatifs des polymères cationiques selon l'invention sont les polyallylamines glycolilées, en particulier un polymère de formule III ($n = 1$) où :

R est - C = O

5

|

CH₂OH

ou encore les polyallylamines éthoxylées, en particulier un polymère de formule IV ($n=1$) où R est -(CH₂)₂-OH

et environ 50 à environ 80 %, de préférence de 50 à environ 70
10 %, de fonction NH₂ libres sont substituées par R. Selon un mode de réalisation encore plus particulier $p = 592$.

Avantageusement, l'invention concerne un polymère cationique tel que défini par les formules I, II, III ou IV et qui comprend en outre au moins un élément de ciblage. De tels éléments de ciblage
15 peuvent permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers (cellules tumorales, cellules de l'épithélium pulmonaire, cellule hématopoïétique, cellule musculaire,...). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers
20 certains compartiments intracellulaires préférés tels que le noyau, les mitochondries,.... Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse des endosomes. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie
25 de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogéniques, de peptides

de localisation nucléaire, ou d'une combinaison de tels composés. En particulier, il peut s'agir de résidus galactosyl permettant de cibler le récepteur des asialoglycoprotéines à la surface des cellules hépatiques, de ligands pouvant interagir avec des récepteurs tels que des récepteurs de facteurs de croissance, des récepteur de cytokines, de lectines, de protéines d'adhésion, il peut également s'agir d'un fragment d'anticorps tel que le fragment Fab, d'un peptide fusogénique INF-7 dérivé de la sous unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus influenza (Plank et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924), d'un signal de localisation nucléaire dérivé de l'antigène T du virus SV40 ou de la protéine EBNA-1 du virus Epstein Barr.

Cet élément de ciblage est lié de manière covalente ou non covalente, au polymère de formule I, ou II, ou III, ou IV. Dans le cas où le polymère cationique est associé à une substance active comportant des charges négatives pour former un complexe selon la présente invention, il est possible que ledit élément de ciblage soit lié à ladite substance active.

Pris isolément, le polymère cationique selon l'invention contient des monomères portant des fonctions NH_2 libres susceptibles dans des conditions de pH appropriées de devenir NH_3^+ . Dans ces conditions, ledit polymère cationique est capable de former un complexe avec au moins une substance, notamment une substance thérapeutiquement active, comportant des charges négatives.

L'invention concerne donc également un complexe comprenant au moins un polymère cationique selon la présente invention associée à au moins une substance thérapeutiquement active, comportant au moins une charge négative.

De manière avantageuse, un tel complexe est caractérisé en ce que ladite substance thérapeutiquement active est choisie parmi les acides nucléiques et les protéines.

Par "acide nucléique", on entend désigner un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel isolé ou de synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique sans limitation de taille. Selon un mode de réalisation préféré, la substance thérapeutiquement active est un acide nucléique choisi parmi le groupe consistant en un cADN ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager ; un ARN antisens; un ribozyme; un ARN de transfert; un ARN ribosomique; ou un ADN codant pour de tels ARN ; un polynucléotide libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules; un acide nucléique associé à au moins un polypeptide, notamment un polypeptide d'origine virale, et plus particulièrement d'origine adénovirale ou rétrovirale, ou un polypeptide synthétique; un acide nucléique associé à un ligand; un acide nucléique associé à des amphiphiles, notamment des lipides, cationiques; un acide nucléique associé à des polymères cationiques différents des polymères selon la présente invention ou à des polymères neutres ou anioniques.

Selon une variante de l'invention, ladite substance thérapeutiquement active comprise dans ledit complexe est un acide nucléique qui comprend un gène d'intérêt et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Un tel gène d'intérêt pourra par exemple coder pour tout ou partie d'un ribozyme ou d'un acide nucléique antisens. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ledit gène d'intérêt code pour tout ou partie d'un polypeptide, notamment d'un polypeptide marqueur (luciférase, β -galactosidase, produit conférant une résistance à un

antibiotique,...) ou d'un polypeptide présentant une activité thérapeutique ou prophylactique (polypeptide thérapeutiquement actif), et plus particulièrement une activité immunogène de type cellulaire ou humorale. Le terme polypeptide s'entend sans
5 restriction quant à sa taille ou son degré de glycosylation. On peut également citer à titre d'exemples de gènes d'intérêt, les gènes codant pour un enzyme, un inhibiteur d'enzyme, une hormone, une cytokine, un récepteur membranaire, un polypeptide structural, un polypeptide formant un canal membranaire, un polypeptide de
10 transport, une molécule d'adhésion, un ligand, un facteur de régulation de la transcription, de la traduction, de la réplication, de la stabilisation des transcripts, un facteur de coagulation, un polypeptide à effet antitumoral, un polypeptide capable de ralentir le développement d'une infection bactérienne,
15 virale ou parasitaire, une toxine, ou un anticorps, tels que par exemple le gène codant pour la protéine CFTR, la dystrophine, le facteur VIII ou IX, E6/E7 de HPV, MUC1, BRCA1, l'interféron β , l'interféron γ , l'interleukine (IL)2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-12, le facteur nécrosant de tumeur (TNF) de type alpha, le
20 GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), le gène tk du virus Herpes Simplex de type 1 (HSV-1), le gène associé au rétinoblastome ou p53 ou tout ou partie d'immunoglobulines, telles que les fragments F(ab)₂, Fab', Fab ou les anti-idiotypes (US 4,699,880). Bien entendu cette liste n'est pas limitative, et
25 l'utilisation d'autres gènes peut être envisagée.

Dans le cas où l'acide nucléique comprend tout ou partie d'un gène d'intérêt codant pour tout ou partie d'un polypeptide, il convient de préciser que ledit acide nucléique comporte en outre les éléments nécessaires afin d'assurer l'expression dudit ADN
30 après transfert dans une cellule cible, notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans

ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices. Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux séquences codantes d'ADN, identiques ou différentes, situées l'une par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou en sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdites séquences ne soit pas affectée. De même, dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques "neutres" ou introns qui ne nuisent pas la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (WO 94/29471). Ledit acide nucléique pourra également renfermer des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la sécrétion, pour la transcription ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art. Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génôme de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine,

qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Avantageusement, on choisira un rapport spécifique entre le nombre de charges positives dudit polymère cationique et le nombre de charges négatives de ladite substance thérapeutiquement active. Sans vouloir être limité par un rapport spécifique, on choisira de préférence des quantités des différentes charges de manière à ce que le rapport entre les charges positives du polymère cationique et les charges négatives de la substance active soit compris entre 1 et 30, notamment entre 1.5 et 10, et de préférence entre 2.5 et 5. Le calcul pour arriver à un tel rapport prendra en considération les charges négatives portées par la substance active et on ajustera la quantité de polymère cationique nécessaire pour satisfaire au rapport indiqué ci-dessus. Lorsque le polymère contient également un ou plusieurs éléments de ciblage, les quantités et les concentrations des éléments de ciblage sont ajustées en fonction de leur masse molaire respective et de leur nombre de charges positives et/ou négatives.

L'invention concerne également un procédé de préparation des complexes polymère cationique/ substance thérapeutiquement active selon l'invention, caractérisé en ce que l'on met en présence un ou plusieurs polymères selon l'invention avec une ou plusieurs substances thérapeutiquement actives comportant au moins une charge négative et en ce que l'on récupère ledit complexe. La récupération dudit complexe peut être assortie d'une phase de purification. Plusieurs techniques de purifications sont envisageables telles que celles reposant sur l'utilisation d'un gradient de densité ou d'une colonne d'affinité, spécifique ou non spécifique. Ces techniques de purification sont bien connues de l'homme du métier qui possède les compétences suffisantes à leur mise en oeuvre.

L'invention porte aussi sur un procédé pour transférer une substance thérapeutiquement active en particulier un acide nucléique dans une cellule cible in vitro, ex vivo ou in vivo caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un complexe selon l'invention avec des cellules cibles. Selon un mode de réalisation du procédé selon l'invention, on met en contact des cellules cultivées sur un milieu approprié avec une suspension comprenant au moins un complexe polymère cationique/substance comportant des charges négatives tel que décrit dans la présente invention. Après un certain temps d'incubation, les cellules sont lavées et récupérées. La vérification de la transfection peut être effectuée par tout moyen approprié, et notamment par mesure de l'expression du gène porté par l'acide nucléique formant complexe avec le polymère cationique ou par mesure de la concentration du polypeptide exprimé. Le procédé de transfection est bien connu en soi et désigne l'introduction d'un acide nucléique d'intérêt dans une cellule aux fins de l'expression dudit acide nucléique.

Par "cellules cibles" selon l'invention, on entend les cellules procaryotes, les cellules de levure et les cellules eucaryotes, notamment les cellules animales, et en particulier les cellules de mammifère, notamment les cellules humaines et/ou cancéreuses. In vivo, les complexes selon l'invention peuvent être administrés au niveau de l'espace interstitiel ou luminal de tissus tels que le poumon, la trachée, la peau, le muscle, le cerveau, le foie, le coeur, la rate, la moelle osseuse, le thymus, la vessie, la lymphe, le sang, le pancreas, l'estomac, le rein, les ovaires, les testicules, le rectum, le système nerveux périphérique ou central, les yeux, les organes lymphoïdes, les cartilages, l'endothélium.

L'expression d'un gène après transfection à l'intérieur des cellules peut être analysée par des techniques classiques telles que par exemple la détection des ARN messagers par Northern blot

ou digestion à la nucléase S1 et/ou la détection de protéines par Western blot immunoprécipitation ou test fonctionnel. Ce dernier test est particulièrement adapté lorsque le gène code pour un marqueur protéique tel que par exemple la luciférase ou la β -galactosidase.

L'invention porte aussi sur l'utilisation de complexes tels que décrits précédemment pour la préparation d'un médicament pour le traitement du corps humain ou animal, notamment par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* ou par une approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient, à les transfecter *in vitro* selon l'invention et à les réadministrer audit patient.

L'invention concerne une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un complexe selon la présente invention.

Selon une variante de l'invention, ladite composition pharmaceutique comprend au moins un adjuvant capable d'améliorer le pouvoir de transfection dudit complexe à l'intérieur d'une cellule cible *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Plus particulièrement ledit adjuvant est choisi parmi le groupe consistant en un agent lysosomotropique tel que par exemple la chloroquine, un composé polaire protique choisi notamment parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tétraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés.

Selon le mode d'administration choisi il est également possible

d'ajouter à la composition de l'invention un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique permettant l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature.

5 Un complexe ou une composition pharmaceutique selon l'invention peuvent être administrés *in vivo* notamment sous forme injectable, notamment par voie intramusculaire. On peut également envisager une injection par voie intratrachéale, intranasale, épidermique, intraveineuse, intraartérielle, intratumorale, intrapleurale,
10 intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation, on peut utiliser des systèmes adaptés au traitement des voies aériennes ou des muqueuses tels que l'inhalation, l'instillation, ou l'aérosolisation, par voie topique, par administration orale ou tout autre moyen parfaitement
15 connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu
20 ou la maladie à traiter, ou encore de l'acide nucléique à transférer ou de l'organe/tissus cible.

Enfin, l'invention concerne une cellule transfectée par un complexe ou une composition pharmaceutique tels que définis précédemment, particulièrement une cellule procaryote, une cellule
25 de levure ou eucaryote, notamment une cellule animale, en particulier une cellule de mammifère, et plus particulièrement une cellule cancéreuse.

La présente invention est illustrée par les exemples 1 à 5 suivants, en référence aux figures 1 à 9.

LÉGENDES DES FIGURES :

Figure 1 : Elle représente un schéma de synthèse des polyallylamines (PAM.) glycolilées à 50% (PAM/0.5G).

Figure 2 : cartographie du plasmide pTG11033.

5 Figure 3 : Influence de la charge du complexe ADN/polymère cationique substitué sur l'efficacité de la transfection. L'efficacité de la transfection est traduite par la quantité de luciférase produite (exprimée en RLU/mg de protéine). Les colonnes grisées "clair" représentent les résultats observés en l'absence
10 d'adjuvant de transfection (chloroquine (Cq)), les colonnes grisées "foncé" représentent les résultats observés en présence de 100µM de chloroquine. PAM/0.5G: polymère polyallylamine glycolilée à 50% ; PAM/0.7G: polymère polyallylamine glycolilée à 70%.

Figure 4 : Influence de la quantité d'ADN sur la transfection.
15 Les colonnes grisées "clair" représentent les résultats observés sans chloroquine (Cq), les colonnes grisées "foncé" représentent les résultats observés en présence de 100µM de chloroquine.

Figure 5: Transfert de gène dans les cellules MRC5. Les colonnes claires représentent les résultats observés avec le PAM/0.5G, les
20 colonnes foncées représentent les résultats observés avec le PAM/0.7G. La présence (Cq) ou l'absence de chloroquine est indiquée en abscisse.

Figure 6: Structure du PLL/0.7G (polylysine glycolilée à 70%).

Figure 7: Comparaison des efficacités de transfection de la
25 PAM/0,7G et la PLL/0,7G. PLL : polymère polylysine non substitué ; PLL/0.7G : polymère polylysine glycolilée à 70%.

Figure 8: Cytotoxicité des polymères cationiques substitués PAM/0.5G et PAM/0.7G.

Figure 9: Cytotoxicité des complexes ADN plasmidique/polymères
30 cationiques substitués (PAM/0.5G ou PAM/0.7G).

Figure 10: Influence du taux de substitution du polymère cationique sur l'efficacité de la transfection. Les colonnes

noires indiquent que l'expérimentation a été conduite en présence de chloroquine, les colonnes blanches en absence de chloroquine.

Figure 11: Influence de la taille des polymères sur l'efficacité de la transfection, en présence ou en absence de chloroquine. Cq : chloroquine. Les courbes identifiées par ■ figurent les résultats observés avec PAM 0.7G, 60kDa et les courbes identifiées par ▲ figurent les résultats observés avec PAM 0.74G, 10kDa.

Figure 12: Transfert de gène dans les cellules Hela. Les complexes utilisés contiennent du PAM 0,7G à différents équivalents de charge (1,5, 2,5 ou 5 Eq) indiqués en abscisse. Les colonnes claires représentent les résultats observés en absence de chloroquine, les colonnes foncées représentent les résultats observés en présence de chloroquine.

Figure 13: Effet de l'addition de JTS-1 aux complexes PAM 0.7G sur la transfection de cellules A549. Les quantités de peptide JTS-1 ajoutées sont indiquées en abscisse. Les colonnes blanches figurent les résultats observés en absence de chloroquine et les colonnes noires en présence de chloroquine. L'activité luciférase est exprimée en RLU mesurée sur 15 secondes.

Figure 14: Structure de la polyallylamine éthoxylée

Figure 15: Transfection des cellules A549 avec les PAMs éthoxylées PAM/0.6E ou PAM/0.8E. Les colonnes blanches figurent les résultats observés en absence de chloroquine et les colonnes noires en présence de chloroquine. Les équivalents de charges analysés sont indiqués en abscisse.

Figure 16: Structure de la polyallylamine glycolylé/éthoxylé

Figure 17: Transfection des cellules A549 avec les PAMs glycolylé 76%/éthoxylé 5 ou 20%. Les colonnes blanches figurent les résultats observés en absence de chloroquine et les colonnes noires en présence de chloroquine. Les équivalents de charges analysés sont indiqués en abscisse.

Figure 18: Injection intraveineuse de PAM/0.7G ou PAM/0.GE dans des souris à un taux de charge fixe de 5.

EXEMPLES

A - Matériel et méthodes.1 . Synthèse chimique des polyallylamines glycolilées (figure 1)

280 mg de polyallylamine, HCl (PAM, p= 592; 55 kDa; soit 3
5 mmoles de fonction ammonium) [Aldrich] sont dissouts à 67°C pendant
environ 10 min dans 1 ml d eau bidistillée. La solution est
ensuite placée à température ambiante. 230 µl de glycolate de
méthyle (Fluka) (3 mmoles) et 500 µl triéthylamine (TEA) (Fluka)
sont ajoutés séquentiellement et agités à température ambiante
10 pendant 72 h. Après évaporation de l'eau sous pression réduite, la
masse solide est reprise dans un mélange 50/50 eau
bidistillée/ammoniaque 36%, puis soumise à une nouvelle
évaporation. Ce traitement est réalisé deux fois afin d'éliminer
entièrement la TEA. Le solide enfin obtenu est repris dans (5 ml)
15 de l'eau bidistillée, acidifiée à pH 1 (HCl), puis précipité par
addition de 500 ml d'acétone. Le précipité est récupéré par
filtration et séché sous vide pendant 12 h. Le polymère est
dissout dans (5 ml) d'eau bidistillée puis lyophilisé. Le produit
ainsi obtenu est substitué à 50% (PAM/0.5G).

20 La synthèse de PAM substitué à 70% (PAM/0.7G) ou de polylysine
glycolilée à 70% (PLL/0.7G) est réalisée selon une variante de ce
protocole pour laquelle on ajoute 6 mmoles de glycolate de
méthyle.

Le taux de substitution des différents produits est déterminé
25 par RMN du proton.

2 . Les cellules

Les cellules A549 (carcinome pulmonaire) et MRC5 (fibroblastes
pulmonaires) sont respectivement maintenues en culture dans un
milieu DMEM (milieu modifié Dulbecco) ou MEM (milieu essentiel
30 minimum) complémenté avec 10 % de sérum de veau foetal, 286 mg/ml
de glutamine et 2 g/l de glucose, dans un incubateur à 37°C, à une

atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂. A confluence, les cellules sont détachées du support par traitement à la trypsine-EDTA et réensemencées dans une fiole de culture contenant 15 ml de milieu frais. Environ 18 heures avant l'étape de transfection, les cultures cellulaires sont réparties dans des boîtes multi-puits, en milieu à 10 % de sérum de veau foetal de façon à obtenir 70-80% de confluence lors de la transfection.

3 . Le plasmide

Le polynucléotide choisi, le plasmide pTG11033 (Figure 2), renferme le gène codant pour la luciférase placé sous le contrôle du promoteur CMV, l'intron 1 du gène HMG et le signal de terminaison polyA de SV40.

4 . Préparation des diverses solutions de polymères PAM/0.5G et PAM/0.7G.

Les concentrations des solutions préparées sont exprimées en millimole de monomère NH₂ non substitué pour un polymère donné. Des solutions 10mM NH₂ sont préparées et stockées à 4°C.

- PAM/0.5G 10 mM (NH₂): Poids Moléculaire 50860,4

Une mole de PAM/0.5G correspond à 295,7 moles de fonctions amines NH₂ non substituées. 45,5 mg de PAM/0.5G (0,9 µmole et donc 264 µmole de NH₂) sont mis en solutions dans 26,4 mL d'eau bidistillée pour obtenir une solution 10 mM (NH₂).

- PAM/0.7G 10 mM (NH₂): Poids Moléculaire 57720,6

Une mole de PAM/0.7G correspond à 177,4 moles de fonctions amines NH₂ non substituées. Afin d'obtenir une solution 10 mM (NH₂) 58 mg de PAM/0.5G (0,9 µmole et donc 160 µmole de NH₂) sont mis en solutions dans 16 mL d'eau bidistillée.

5 . Préparation des complexes ADN/ polymères (PAM/0.5G ou

PAM/0.7G).

Dans deux tubes Eppendorf de 1,5 ml, les quantités nécessaires (voir tableau ci-dessous) de polymère et de plasmide sont respectivement diluées dans 150 μ l de NaCl ou 150 μ l de HEPES 20 mM pH 7,5. La solution est mélangée au vortex puis centrifugée. Après 10 min, les deux solutions sont mélangées et le mélange est placé à température ambiante. Après 10 min d'incubation, les complexes formés peuvent être utilisés pour la transfection de cellules.

nombre d'équivalents (eq.)	2,5	5
Volume de solution de polymère 10 mM (NH ₂)	1,5 μ l/2 μ g* 3 μ l/4 μ g*	3 μ l/2 μ g* 6 μ l/4 μ g*

* : Quantité de plasmide.

La proportion d'amines protonées du polymère à pH donné, n'étant pas connue de manière exacte, les complexes analysés sont exprimés en équivalents (eq) d'azote par rapport au phosphate de l'ADN (N/P). Ainsi un équivalent représentera la quantité de polymère nécessaire pour avoir un azote par groupement phosphate de l'ADN (Felgner et al., 1997, Human Gene Therapy, 8, 511-512).

6 . Transfection

100 μ l du complexe obtenu au point 5 sont versés sur les cellules distribuées en multi-puits comme décrit précédemment, préalablement rincées avec du milieu frais sans sérum. Après 2 à 3 h, le milieu est substitué par du milieu complété avec 10% de

Sérum de Veau Foetal. Le taux d'expression du gène luciférase est mesuré après 48 h. Pour cela, les cellules transfectées sont lysées dans un tampon de lyse (Promega). Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation et l'activité luciférase (en RLU/min, Unité de lumière relative par minute) est mesurée sur 20 µl de surnageant conformément aux instructions du fournisseur (Promega) en ajoutant 100 µl de réactif et en mesurant l'activité par luminescence. La quantité de protéine totale est, par ailleurs, déterminée par la méthode colorimétrique d'acide bicinchoninique BCA (Smith et al., 1985, Anal. Biochem., 150, 76-85 Pierce) à partir d'un aliquote de surnageant. Ceci permet d'exprimer l'activité luciférase en RLU par milligramme de protéine extraite des cellules.

7 . Transfection en présence de chloroquine 100 µM:

Selon une variante de la technique de transfection proposée ci-dessus, Le volume nécessaire d'une solution 10 mM de chloroquine est ajouté au milieu de culture juste avant l'addition du complexe ADN/polymère de manière à obtenir une concentration finale par puits de 100 µM.

B - RÉSULTATS

Exemple 1: Transfert de gène dans les cellules A549 et influence de la charge du complexe ADN/polymère cationique.

Dans un premier temps, différents complexes sont formés selon le protocole exposé plus haut en ajoutant deux quantités différentes de PAM/0,5G 10mM ou de PAM/0,7G 10 mM à une quantité fixe de plasmide (2µg), afin d'obtenir différents ratios N/P (équivalents ; 2.5 ou 5 eq). Ceci permet d'étudier si la charge totale du complexe formé par interactions électrostatiques entre les amines du polymère cationique analysé et les phosphates de l'ADN plasmidique joue un rôle sur l'efficacité de la transfection. Les

résultats (figure 3) montrent que les PAMs glycolilées à 50% ou à 70% sont capables de transférer efficacement l'ADN dans les cellules, même à faible équivalent de charge. On peut par ailleurs noter que la présence de chloroquine (100 μ M) permet d'améliorer l'efficacité de transfection.

Exemple 2: Effet de la quantité d'ADN sur l'efficacité de la transfection.

Les complexes pour cette série d'expériences sont formés en mélangeant des quantités croissantes d'ADN plasmidique (2, 4 ou 6 μ g) et des quantités variables de PAM/0,5G ou de PAM/0,7G afin d'obtenir des ratios N/P de 1.5 eq, 2.5 eq ou 5 eq. Les résultats obtenus (figure 4) après transfection des cellules A549 avec ces différents complexes montrent que les polymères PAM/0,5G et PAM/0,7G permettent une transfection efficace des cellules, avec ou sans chloroquine, quelle que soit la quantité d'ADN. Il est en outre intéressant de noter que la chloroquine n'est pas indispensable pour obtenir un taux d'efficacité performant lorsque l'on utilise pour la transfection un complexe ADN/PAM/0,7G préparé à partir de 4 μ g d'ADN et à 5 équivalents de charge.

Exemple 3: Transfert de gène dans les cellules MRC5

Il est connu que l'efficacité du transfert de gène par utilisation de vecteurs non-viraux peut varier notamment en fonction du type cellulaire considéré. Nous avons donc testé notre système de transfection sur un autre type cellulaire tumoral, les MRC5, considérées comme des cellules difficilement transfectables (Boussif et al., 1996, Gene Therapy, 3, 1010 - 1017). Les complexes ont été préparés comme décrit précédemment en mélangeant des quantités variables d'ADN plasmidique (2 ou 4 μ g) et des quantités variables de polymères cationiques PAM/0,5G ou PAM/0,7G de façon à obtenir des valeurs d'équivalents de charge de 2.5 ou

de 5 eq. Par ailleurs, les transfections ont été réalisées en présence ou en l'absence de chloroquine ($100\mu\text{M}$).

Les résultats présentés à la figure 5 montrent que les cellules MRC5 sont transfectées efficacement dans les conditions
5 expérimentales testées.

Exemple 4: Comparaison des efficacités de transfection des PAM/0,7G et PLL/0,7G

Afin de montrer l'importance de la nature chimique du polymère, les efficacités de transfection du PAM/0,7G à celles observées
10 avec un analogue obtenu à partir de la polylysine (PLL) dont 70% des fonctions NH_2 libres ont été glycolilées comme décrit en A.1. (Figure 6).

La transfection des cellules A549 a été réalisée comme décrit précédemment en utilisant des complexes ADN/polymère cationique
15 pour lesquels ledit polymère est du PAM/0,7G ou du PLL/0,7G ou de la polylysine non substituée. En outre, ces complexes ont été préparés avec différentes quantités d'ADN (2 ou $4\mu\text{g}$), et en faisant varier le rapport N/P (2.5 ou 5 eq).

Les résultats obtenus (figure 7) montrent que la substitution à
20 70% du polymère PLL ne permet pas d'améliorer les faibles taux d'expression observés avec la polylysine non-modifiée (PLL) qui sont de 50 à 100 fois plus faibles que ceux observés dans des conditions identiques avec la PAM/0,7G.

Exemple 5: Cytotoxicité des polymères et des complexes
25 ADN/Polymère

La cytotoxicité des polymères PAM substitué et non substitué a été analysée en réalisant un test colorimétrique au MTT (bromure du 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (Mossman T., 1983, Journal of Immunological Methods, 65, 55-63).

30 Dans un premier temps, les cellules A549 en culture sont placées

en présence de quantités croissantes de polymères non complexé. Ces quantités correspondent aux quantités nécessaires pour former des complexes avec 4 µg d'ADN et pour obtenir des rapports N/P allant de 2,5 à 30 eq.

5 Les résultats (figure 8) montrent que les PAM/0,5G et PAM/0,7G sont beaucoup moins toxiques à l'égard des cellules que le polymère PAM non substitués (Remarque: 100% de viabilité correspond aux cellules n'ayant subi aucun traitement).

10 Dans un second temps, une série d'expériences similaires a été réalisée avec les mêmes polymères sous une forme de complexe polymères cationique/ADN (4µg de plasmide). Les taux de viabilité cellulaires présentées sur la figure 9 confirment que les complexes polymère cationique/ADN selon l'invention sont très faiblement toxiques à l'égard des cellules.

15 La viabilité cellulaire observée avec la PAM/0,7G à 30 équivalents est supérieure à 70%. Ceci est très prometteur pour les essais *in vivo* pour lesquelles les quantités d'ADN et par conséquent de polymère, à utiliser peuvent être importantes.

20 Exemple 6: Transfert de gène dans les cellules A549 et influence du taux de substitution du polymère cationique.

Différents polymères cationiques selon l'invention sont préparés dont les taux de substitution varient de 70 à 85 %. Conformément aux protocoles exposés plus haut, plusieurs complexes sont formés
25 à partir d'une quantité fixe de plasmide pTG11033 (2µg) et de ces différents polymères cationiques (0.7G, 0.74G, 0.76G, 0.79G, 0.85G) de façon à obtenir différents ratios N/P (équivalents ; 1.5, 2.5 ou 5 eq). Ceci permet d'étudier si le taux de substitution du polymère joue un rôle sur l'efficacité de
30 transfection. Pour chaque série, cinq expériences indépendantes ont été réalisées. Par ailleurs, le polymère ExGen500 (Euromedex,

Souffelweirsheim, France) complexé à 2 µg de plasmide est utilisé à titre de standard. Les résultats (figure 10) montrent que les PAMs glycolilées de 70% à environ 76% sont capables de transférer efficacement l'ADN dans les cellules, même à faible équivalent de charge, et qu'au delà (79 et 85%), une décroissance de l'efficacité est observée, avec ou sans chloroquine (100 µM).

Exemple 7: Effet de la taille des polymères.

Des polymères cationiques selon l'invention, avec deux degrés différents de polymérisation (60 kDa et 10 kDa Aldrich) présentant des taux de substitution comparables (74% et 70%) sont préparés. Des complexes sont formés selon les protocoles décrits précédemment pour lesquels la quantité de plasmide complexé varie de 0.1 à 2 µg, les ratios N/P varient de 1.5, 2.5 à 5 eq. Les résultats obtenus (figure 11) après transfection des cellules A549 avec ces différents complexes, en présence ou en absence de chloroquine, montrent que la taille du polymère utilisé n'influence pas sa capacité à transfecter les cellules.

Exemple 8: Transfert de gène dans les cellules HeLa

Nous avons également testé notre système de transfection sur un autre type cellulaire, les cellules HeLa, lignée dérivée d'un carcinome du cervix humain. Les complexes ont été préparés comme décrit précédemment en mélangeant 2 µg d'ADN plasmidique et des quantités variables de polymères cationiques PAM/0,7G de façon à obtenir des valeurs d'équivalents de charge de 1.5, 2.5 ou de 5 eq. Par ailleurs, les transfections ont été réalisées en présence ou en l'absence de chloroquine (100 µM).

Les résultats présentés à la figure 12 montrent que les cellules HeLa sont transfectées efficacement dans les conditions expérimentales testées.

Exemple 9: Influence d'un peptide disrupteur d'endosome sur

l'efficacité de la transfection.

Dans cet exemple, nous avons réalisé des expériences de transfection de complexes pTG11033/PAM0.7G, 2.5 eq ou pTG11033/PAM 0.7G, 5 eq en association avec un peptide disrupteur d'endosome
5 (peptide JTS1 décrit par Gottschalk et al., 1996, Gene Therapy, 3, 448-457).

Environ 24 heures avant la transfection, des plaques "24 puits" sont ensemencées avec 10⁵ cellules A549 par puits de 1 ml. Le milieu de culture est le DMEM + glutamine + gentamycine + 10% de
10 sérum de veau foetal. Le lendemain, différentes quantités de JTS1 (voir figure 13) sont ajoutées à 20 µl de complexes pTG11033/PAM 0.7G, 5 eq ou pTG11033/PAM 0.7G, 2.5 eq (ces complexes sont préparés comme décrits précédemment et renferment 2 µg de pTG11033). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante,
15 les mélanges sont dilués dans du milieu DMEM sans sérum de manière à obtenir une concentration finale de plasmide de 1 µg/ml. 200 µl de cette préparation (soit l'équivalent de 200 ng de plasmide) sont déposés sur les cellules (pour chacun des complexes, l'expérience est reproduite sur 3 puits différents) en absence ou en présence
20 de chloroquine (100 µM final) après aspiration du milieu de culture. 800 µl de milieu contenant 10% de sérum sont ajoutés 3 à 4 heures après la transfection.

L'expression du gène codant pour la luciférase est mesurée 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées sont
25 lysées dans 100 µl de tampon de lyse (Proméga) et congelées à -80°C. Après dégel, 20 µl d'extraits sont prélevés pour le dosage de la luciférase. Un luminomètre Microlumat (Berthold Microlumat LB96P) est utilisé pour quantifier la production de luciférase. 100 µl de réactif (Luciferase assay system, Proméga) sont ajoutés
30 sur les extraits et la luminescence exprimée en RLU est mesurée

pendant 15 sec.

Les résultats (figure 13) montrent que l'addition de JTS1 permet d'augmenter l'efficacité de transfection d'environ 250 à 300 fois en absence de chloroquine. En présence de chloroquine, l'efficacité de transfection des complexes PAM 0.7G est fortement augmentée. L'addition de JTS1 permet d'augmenter l'efficacité de transfection de 5 (PAM 0.7G, 2.5 eq) à 13 fois (PAM 0.7G, 5 eq).

Exemple 10 : Synthèse chimique des polyallylamine éthoxylées PAM/0.6E et PAM/0.8E (figure 14).

- 10 Conformément à la présente invention, nous avons préparé des polyallylamines substituées par un autre groupe hydrophile. Pour ce faire, 0.2854 g (2.762 mmoles de fonction amine) de PAM-HCl (Aldrich-28,322-3) en solution dans 0.5 ml d'eau milliporée sont ajoutés à 198 ml d'iodoéthanol (0.92 équivalents - 2.541 mmoles).
- 15 Sont ensuite ajoutés a) 2 ml de DMSO afin de satisfaire aux contraintes de solubilité de l'iodoéthanol et b) 0.74 ml de triéthylamine (5.524 mmoles). Après une agitation à 30°C pendant 72h00, le milieu est évaporé sous vide, et trois co-évaporations avec de l'ammoniaque à 18% permettent d'éliminer la triéthylamine.
- 20 Le résidu est repris dans l'eau puis est acidifié par ajout d'HCl concentré. Le volume final de la phase aqueuse est 60 ml. Trois extractions avec 20 ml d'éther sont réalisées afin d'éliminer la majorité de l'iodoéthanol résiduel. La phase aqueuse est concentrée au Rotavap™ puis précipitée dans 600 ml d'acétone.
- 25 Après filtration sur fritté, le solide est repris dans l'eau. Après dialyse contre plusieurs bains de 4 l d'eau milloporée, l'échantillon est lyophilisé. Le degré de fonctionnalisation est déterminé par RMN du proton. Selon les conditions décrites ci-dessus, 60% des fonctions amines primaires du polymère sont
- 30 ethoxylées. De façon identique, le protocole a été adapté de manière à obtenir des polymères dont 80% des fonctions amines

primaires sont éthoxylées.

Exemple 11 : Transfection des cellules A549 avec les PAMs éthoxylées PAM/0.6E ou PAM/0.8E.

Les complexes ADN/polymères (PAM/0.6E ou PAM/0.8E) sont préparés
5 dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour la
préparation des complexes comprenant des PAM glycolylées, en
particulier les équivalents de charges sont définis de la même
façon (amine potentiellement protonable/Phosphate de l'ADN).
Conformément au protocole décrit pour les PAM glycolylées, les
10 cellules A549 sont transfectées avec 2 µg de plasmide pTG11033
complexé à la quantité désirée de polymère, en présence ou en
absence de chloroquine (100 µM finale). L'activité luciférase est
mesurée après 48 heures d'incubation. Les résultats (figure 15)
confirment que la substitution des polyallylamines par un groupe
15 de nature hydrophile permet d'observer un taux de transfection
efficace, en présence et en absence de chloroquine.

Exemple 12 : Transfection des cellules A549 avec les PAMs à la fois éthoxylées et glycolylées: PAM/0.76G/0.05E ou PAM/0.76G/0.2E.

Les complexes ADN/polymères (PAM/0.76G/0.05E ou PAM/0.76G/0.2E)
20 sont préparés dans les mêmes conditions que celles précédemment
décrites pour la préparation des complexes comprenant des PAM
glycolylées, en particulier les équivalents de charges sont
définis de la même façon (amine potentiellement
protonable/Phosphate de l'ADN). Conformément au protocole décrit
25 pour les PAM glycolylées, les cellules A549 sont transfectées avec
2 µg de plasmide pTG11033 complexé à la quantité désirée de
polymère, en présence ou en absence de chloroquine (100 µM
finale). L'activité luciférase est mesurée après 48 heures
d'incubation. Les résultats (figure 17) confirment que la
30 substitution des polyallylamines par un groupe de nature

hydrophile permet d'observer un taux de transfection efficace, en présence et en absence de chloroquine.

Exemple 13 : Injection intraveineuse de PAM glycolylée PAM/0.7G
5 ou de PAM éthoxylée PAM/0.6E dans des souris

Les résultats sont reportés sur la figure 18. Des complexes ADN/polymère selon l'invention ont été synthétisés dans une solution 5% glucose selon les méthodes décrites précédemment à partir du polymère cationique PAM 0.7G ou le polymère cationique
10 PAM 0.6E, à un ratio de charge fixe de 5, en utilisant un plasmide contenant le gène de la luciférase pTG11033 (demande de brevet français n°97/08267).

Les souris utilisées sont des souris femelles C57BL/6 de 6 semaines . Les injections intraveineuses sont effectuées dans la
15 queue après désinfection de la peau à l'éthanol 70%. Le volume injecté est 250µl et la concentration en ADN est 0.24 mg/ml. Un jour après les injections, les souris sont sacrifiées. Après extraction, les tissus sont congelés dans de l'azote liquide. Afin de mesurer l'activité luciférase, les tissus sont mis dans
20 200 ou 500 µl de tampon de lyse (Promega) et puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur Polytron (Kinenatica). Les tissus sont soumis à une homogénéisation de 2 x 30 s et pendant les premières 5 s la vitesse de rotation du Polytron est augmentée graduellement jusqu'au maximum (position 11 sur l'appareil).
25 L'homogénat ainsi obtenu à partir des poumons est soumis à trois étapes de congélation/décongélation. Les débris cellulaires sont culotés par centrifugation et l'activité luciférase (en RLU/min, Unité de lumière relative par minute) est mesurée sur 20 µl de surnageant conformément aux instructions du fournisseur
30 (Promega) en ajoutant 100µl de réactif et en mesurant l'activité par luminescence (luminomètre Berthold 9500). La quantité de protéine totale est, par ailleurs, déterminée par la méthode colorimétrique d'acide bicinchoninique BCA (Smith et al., 1985, Anal. Biochem., 150, 76-85 Pierce) à partir d'un aliquote de

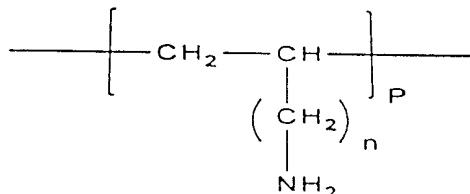
surmeant. Ceci permet d'exprimer l'activité luciférase en RLU par milligramme de protéines extraites des tissus. Des souris non injectées ont été utilisées comme témoin négatif.

Les résultats montrent une expression du gène rapporteur
5 luciférase dans les poumons après injection intraveineuse de complexes tels que décrits ci-dessus par rapport aux souris non injectées. Les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes obtenues à partir de 2 (non injectées), 3 (PAM 0.7G) et 1 (PAM 0.6 E) souris injectées.

REVENDICATIONS

1. Polymère cationique de formule :

5

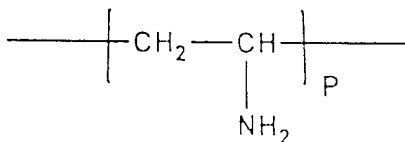


pour lequel n est un nombre entier variant de 0 à 5 et p est un nombre entier variant de 2 à 20000, plus particulièrement p varie de 10 à 18000, et avantageusement de 200 à 1000,

caractérisé en ce que :

- au moins 10%, avantageusement de 30 à 80%, préférentiellement 70%, des fonctions NH_2 libres sont substituées par des groupes R hydrophiles identiques ou différents,
- ledit polymère cationique peut en outre comprendre au moins un élément de ciblage associé de manière covalente ou non aux fonctions NH_2 libres et/ou auxdits groupes R hydrophiles sous réserve que ledit polymère cationique contienne au moins 20%, préférentiellement au moins 30%, de fonctions NH_2 libres.

2. Polymère selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



(n=0)

3. Polymère selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



(n=1)

4. Polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que lesdits groupes hydrophiles R comprennent au moins une fonction hydrophile choisie parmi les fonctions amine, hydroxyle, amide et ester.

5. Polymère selon l'une quelconque de revendications 1 à 4 caractérisé en ce que R est choisi parmi les groupes $\text{R}'-\text{C}=\text{O}$ et $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{R}'$, où R' désigne un groupement contenant au moins une fonction hydrophile n' est un nombre entier variant de 1 à 5.

20 6. Polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R ou R' consiste en un polymère présentant des propriétés hydrophiles.

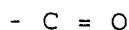
7. Polymère selon la revendication 6, caractérisé en ce que R ou R' est choisi parmi le polyéthylène glycol et ses dérivés, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthoxyazoline, le polyéthoxyazoline, le polyhydroxypropyl méthacrylamide, l'acide polylactique, l'acide polyglycolique et les dérivés de celluloses tels que l'hydroxyméthylcellulose ou l'hydroxyéthylcellulose.

8. Polymère selon la revendication 7, caractérisé en ce que R ou R' est le polyéthylène glycol (PEG) ayant un poids moléculaire

variant de 300 à 5000, plus particulièrement de 1000 à 4000 et
avantageusement ayant un poids moléculaire de 2000 (PEG 2000).

9. Polymère selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé
en ce qu'il s'agit d'une polyallylamine glycolilée.

5 10. Polymère selon la revendication 9, caractérisé en ce que R
est



et environ 50 à environ 70 % de fonctions NH_2 libres sont
10 substituées par R.

11. Polymère selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé
en ce qu'il s'agit d'une polyallylamine éthoxylée.

12. Polymère selon la revendication 11, caractérisé en ce que R
est $-(CH_2)_n-OH$

15 et environ 50 à environ 80 % de fonctions NH_2 libres sont
substituées par R.

13. Polymère selon la revendication 10 ou 12, caractérisé en ce
que $p = 592$.

14. Polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 13
20 caractérisé en ce que ledit élément de ciblage est présent et en
ce qu'il est choisi parmi le groupe consistant en tout ou partie
de sucres, de peptides, d'oligonucléotides, de lipides,
d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands
spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de
25 réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogéniques, de peptides
de localisation nucléaire, ou d'une combinaison de tels composés.

15. Complexe comprenant au moins un polymère cationique selon
l'une des revendications 1 à 14, associé à au moins une substance

thérapeutiquement active comportant au moins une charge négative.

16. Complexe selon la revendication 15, caractérisé en ce que la substance thérapeutiquement active est choisie parmi les acides nucléiques et les protéines.

5 17. Complexe selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance thérapeutiquement active est un acide nucléique choisi parmi le groupe consistant en un cADN, un ADN génomique, un ADN plasmidique, un ARN messager, un ARN antisens, un ribozyme, un ARN de transfert, un ARN ribosomique, ou un ADN codant pour de
10 tels ARN.

18. Complexe selon la revendication 17 caractérisé en ce que ledit acide nucléique comprend un gène d'intérêt et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt.

19. Complexe selon la revendication 18, caractérisé en ce que
15 ledit gène d'intérêt code pour tout ou partie d'un ribozyme, d'un acide nucléique antisens, d'un polypeptide, notamment thérapeutiquement actif ou marqueur.

20. Complexe selon l'une des revendications 15 à 19, caractérisé en ce que le rapport entre le nombre de charges positives dudit polymère cationique et le nombre de charges négatives de ladite
20 substance thérapeutiquement active varie de 1 à 30, de préférence de 1,5 à 10 et avantageusement de 2,5 à 5.

21. Procédé de préparation d'un complexe polymère cationique/
substance active selon l'une des revendications 15 à 20,
25 caractérisé en ce que l'on met en présence un ou plusieurs polymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 avec une ou plusieurs substances thérapeutiquement actives comportant au moins une charge négative et en ce que l'on récupère ledit

complexe éventuellement après une étape de purification.

22. Procédé pour transférer une substance thérapeutiquement active dans une cellule cible in vitro, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules cibles avec au moins un complexe selon
5 l'une quelconque des revendications 15 à 20.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que ladite cellule cible est choisie parmi les cellules procaryotes, les cellules de levure, les cellules eucaryotes, notamment les cellules animales, et plus particulièrement les cellules de
10 mammifères, notamment les cellules humaines et/ou cancéreuses.

24. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 15 à 20 pour la préparation d'un médicament pour le traitement du corps humain ou animal, notamment par thérapie génique.

25. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce
15 que le médicament est destiné à être administré sous forme injectable, notamment par voie intramusculaire.

26. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré par inhalation, par instillation, par aérosolisation, par voie topique ou par voie
20 orale.

27. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un complexe selon l'une quelconque des revendications 15 à 20.

28. Composition selon la revendication 27 caractérisée en ce
25 qu'elle comprend au moins un adjuvant capable d'améliorer le pouvoir de transfection dudit complexe à l'intérieur d'une cellule cible in vitro, ex vivo ou in vivo.

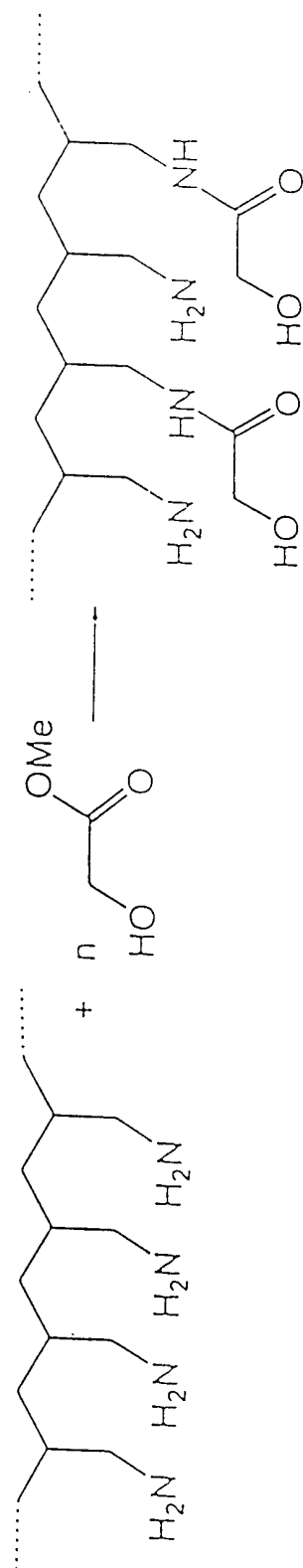
29. Composition selon la revendication 28, caractérisée en ce que ledit adjuvant est choisi parmi le groupe consistant en un agent lysosomotropique tel que la chloroquine, un composé polaire protique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L -2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés.

30. Composition selon l'une des revendications 27 à 29 caractérisée en ce qu'elle comprend un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique permettant son administration à l'homme ou l'animal.

31. Cellule transfectée par un complexe selon l'une des revendications 15 à 20 ou une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 27 à 30.

1/18

FIGURE 1



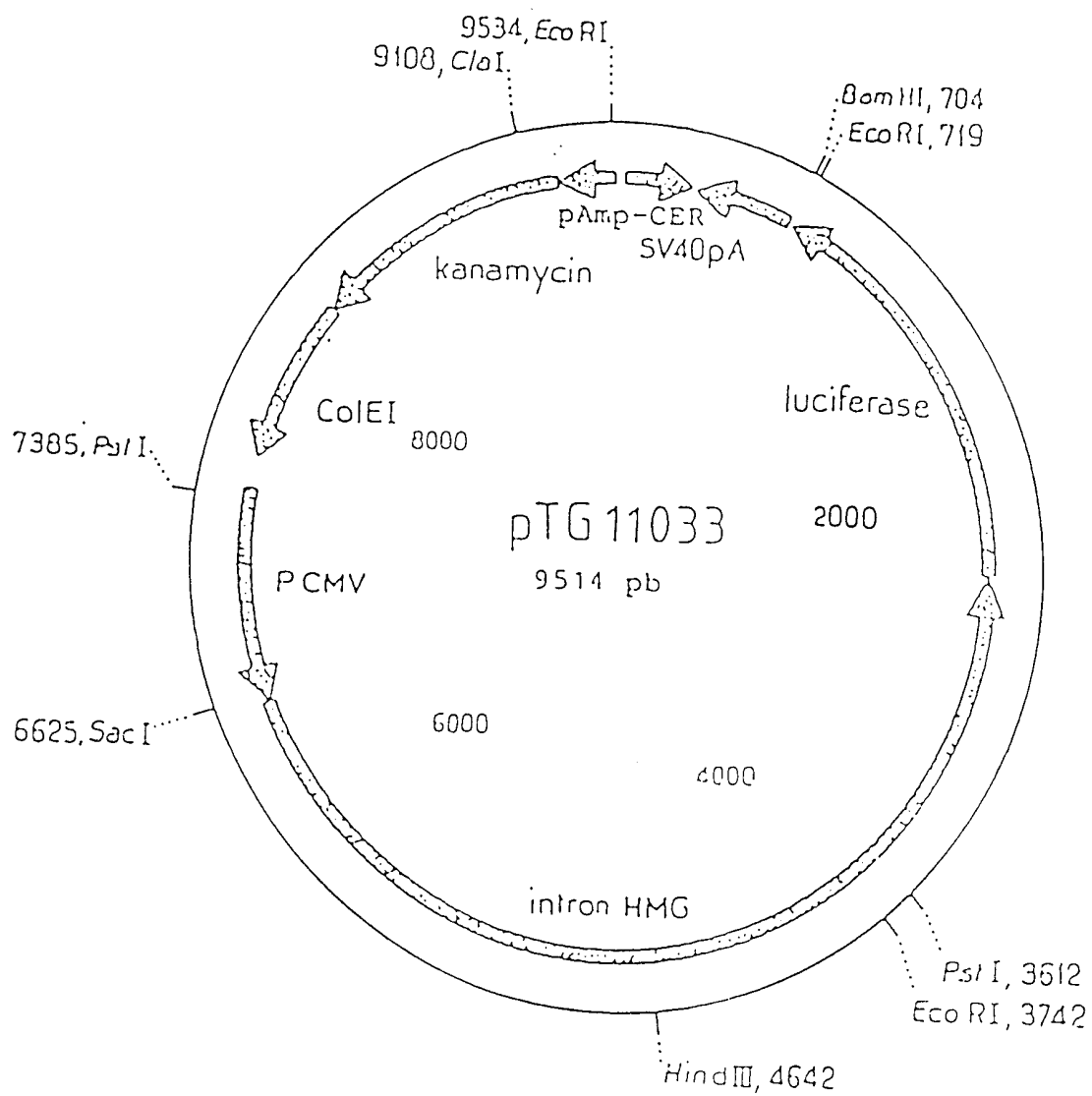


FIGURE 2

FIGURE 3

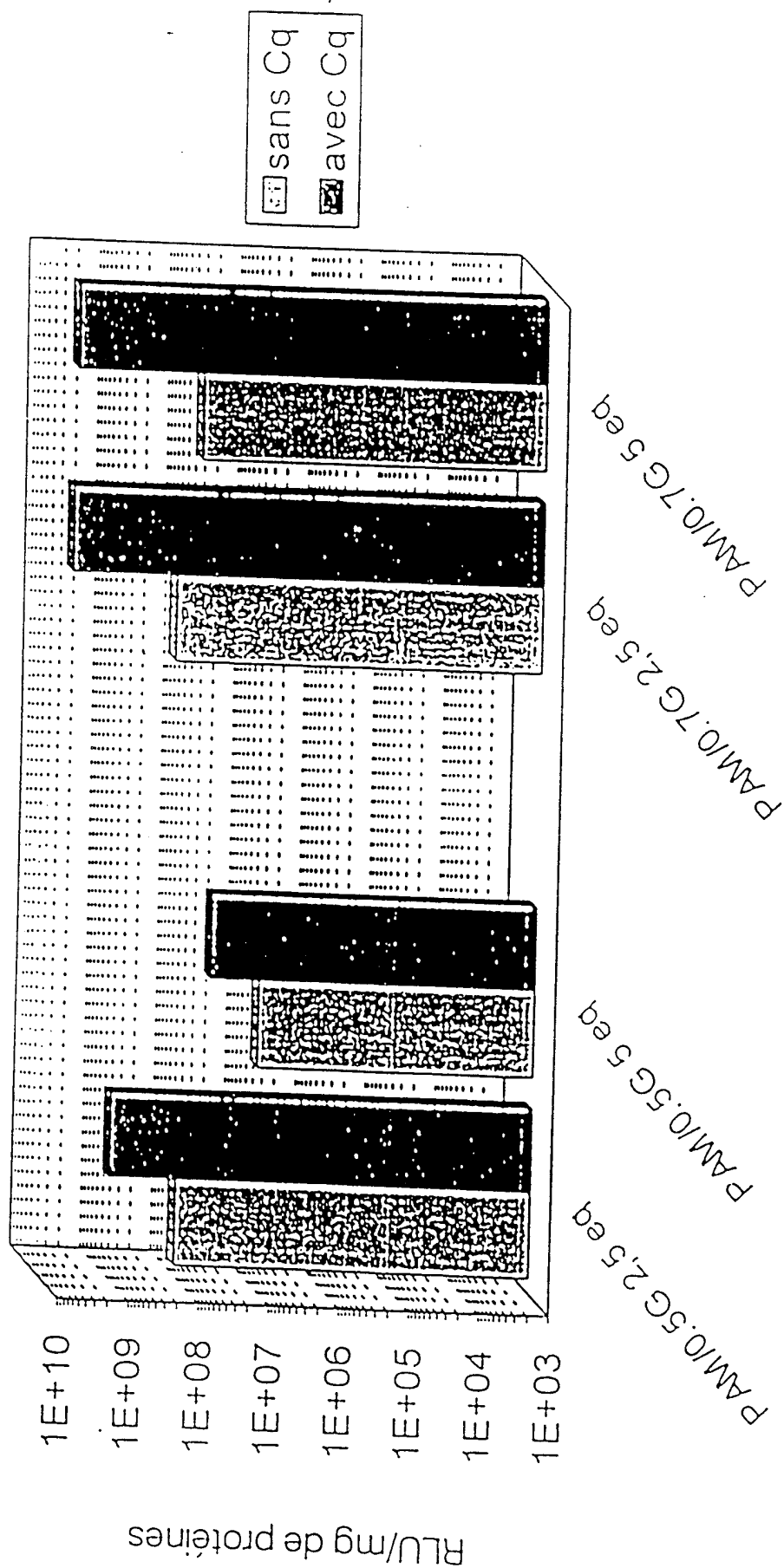


FIGURE 4

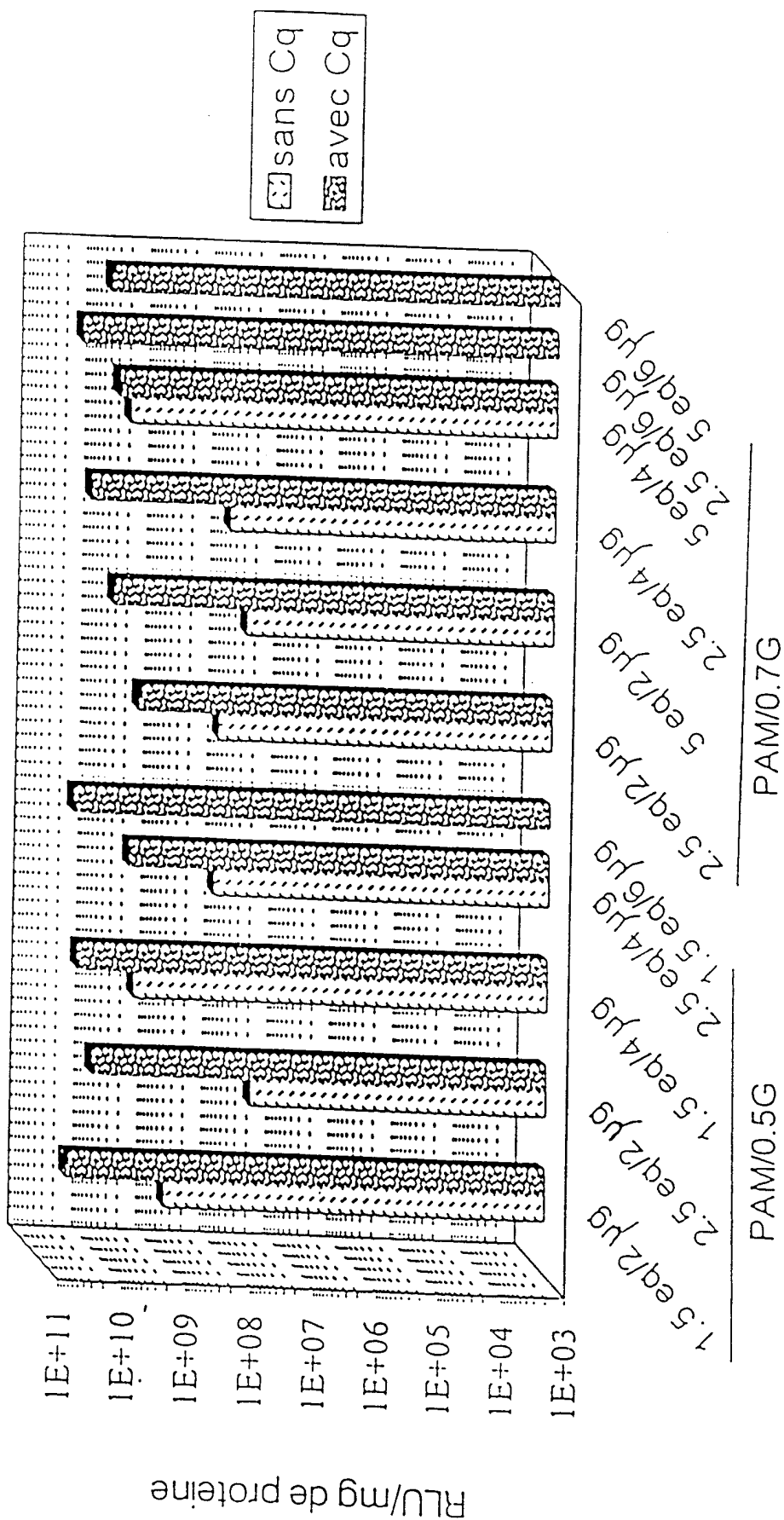


FIGURE 5

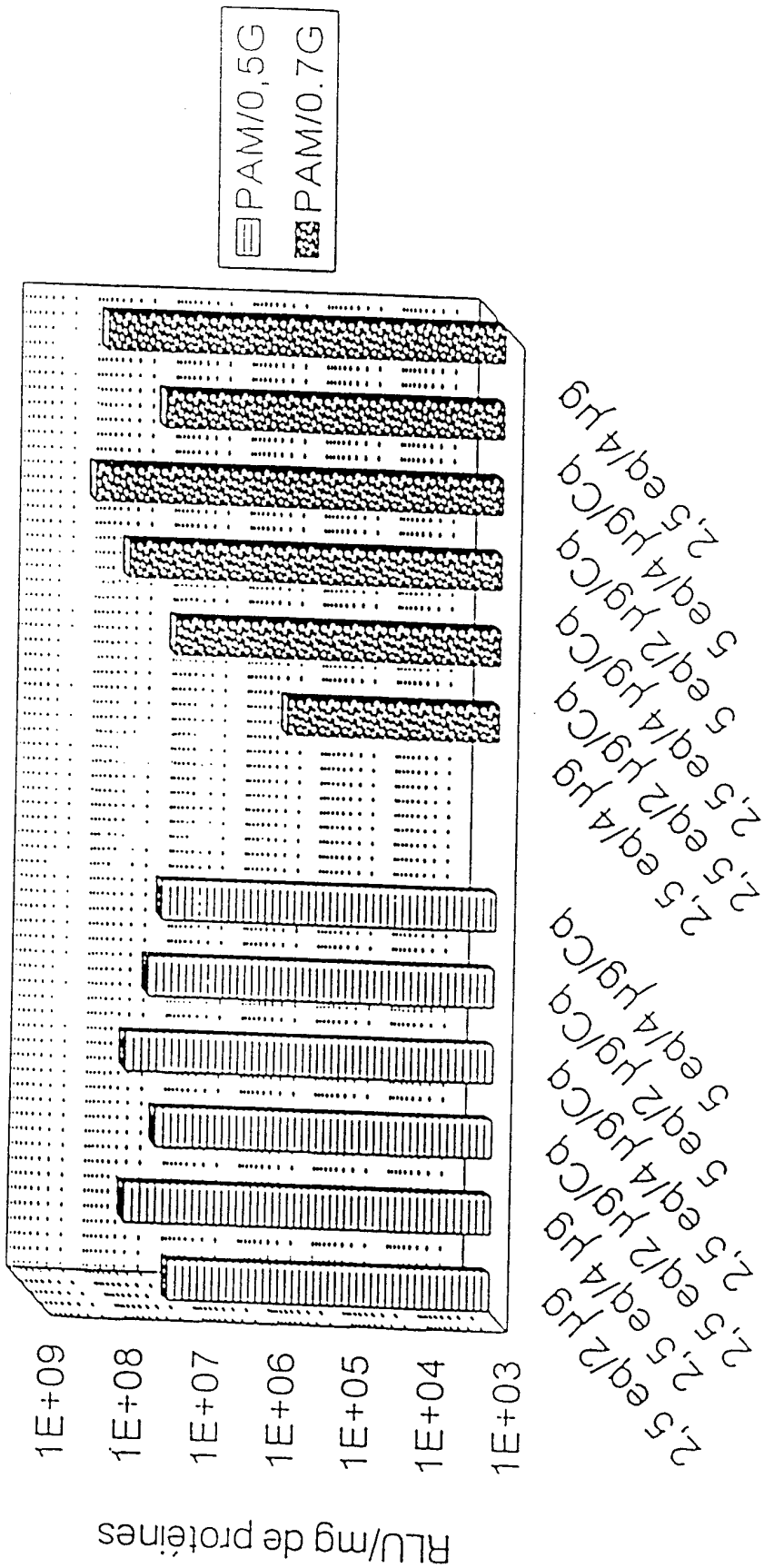
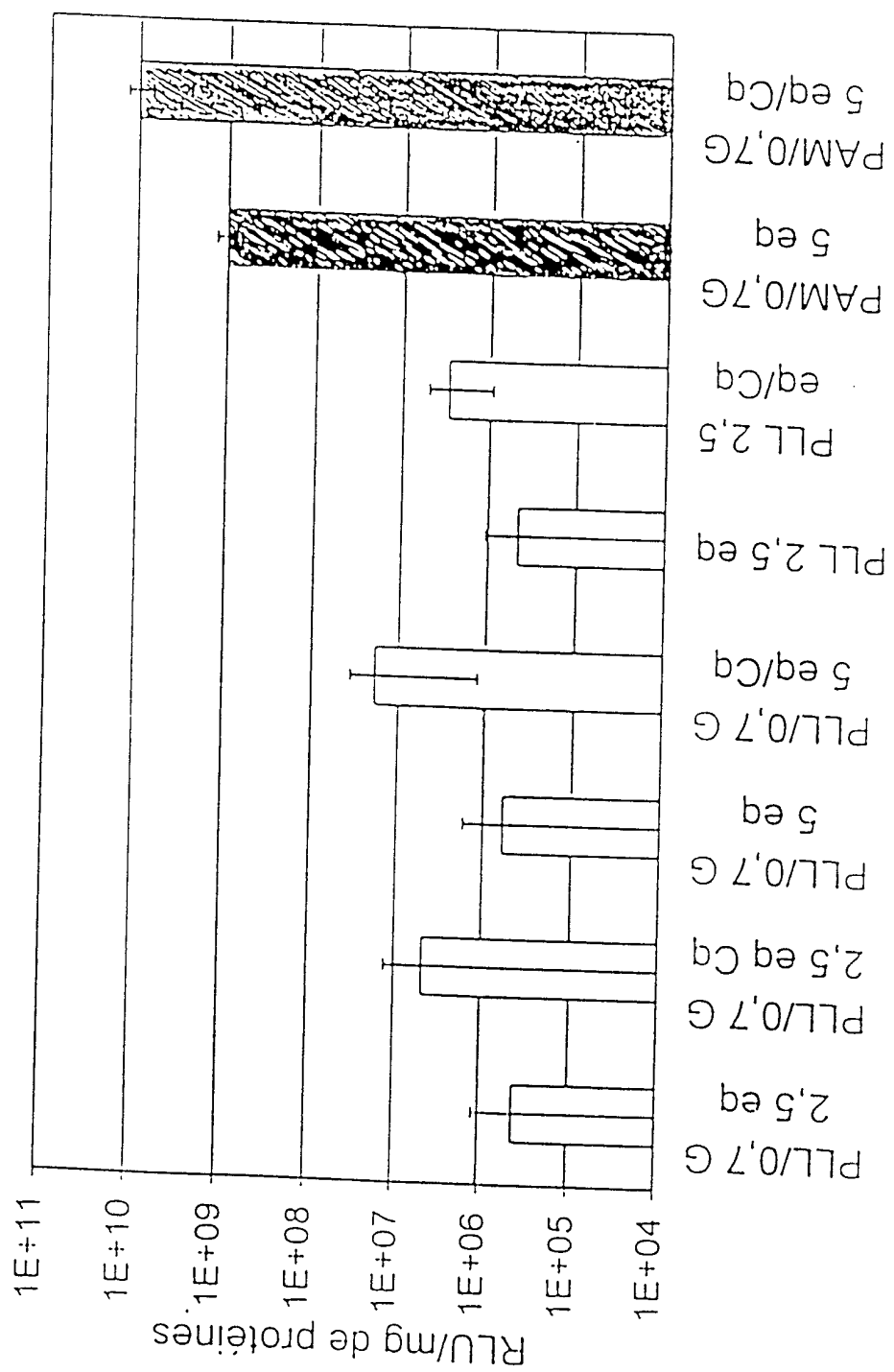
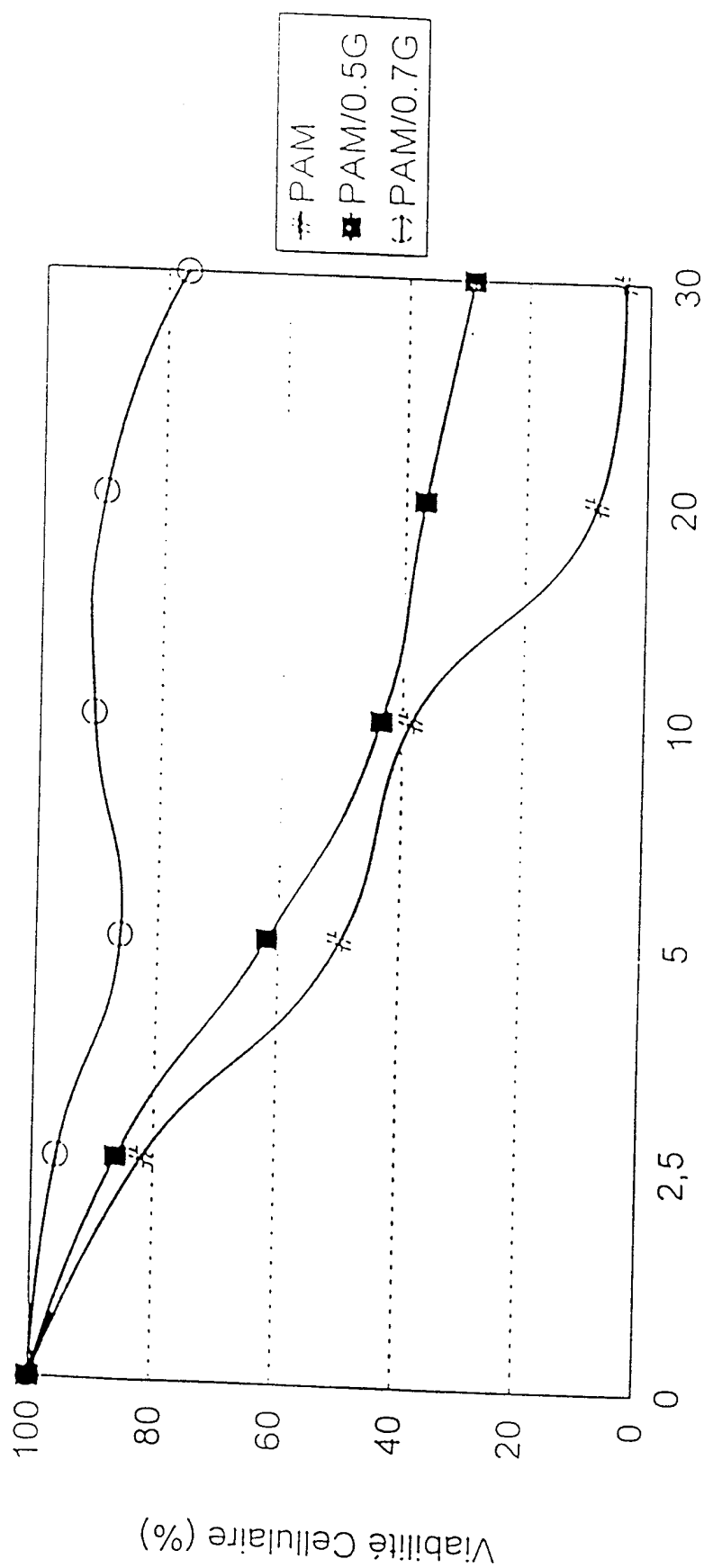


FIGURE 7



8/18

FIGURE 8



9/18

FIGURE 9

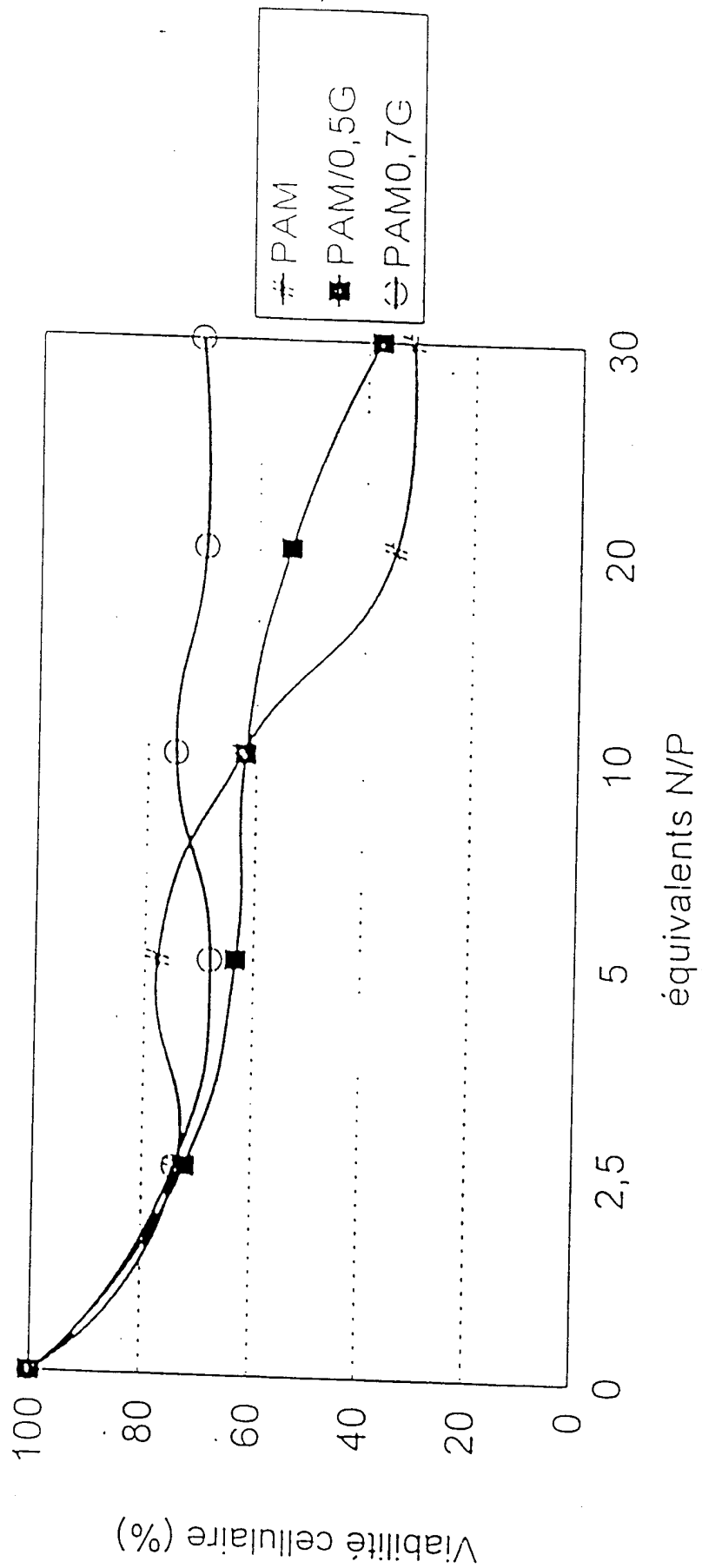


FIGURE 10

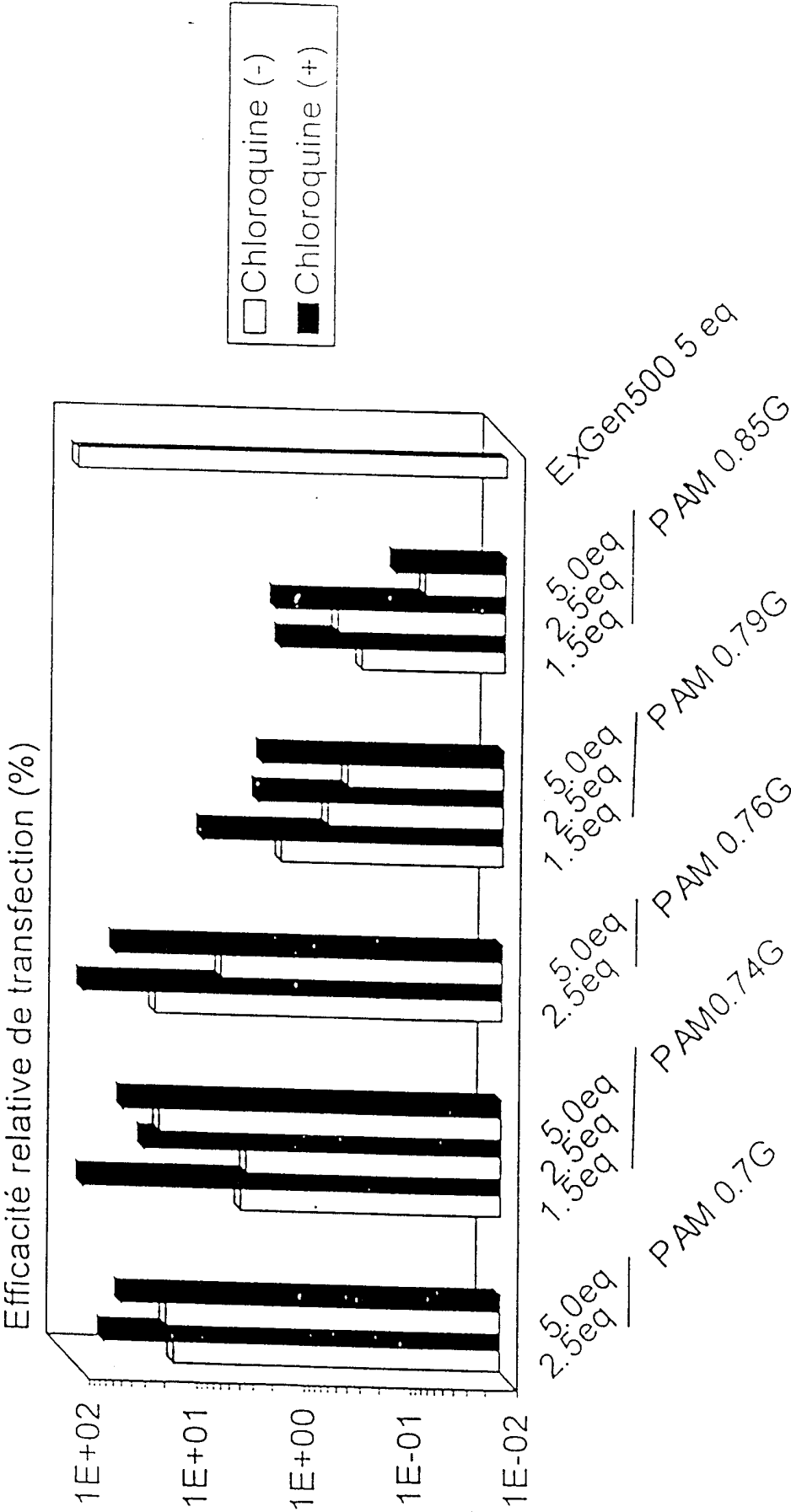


FIGURE 11

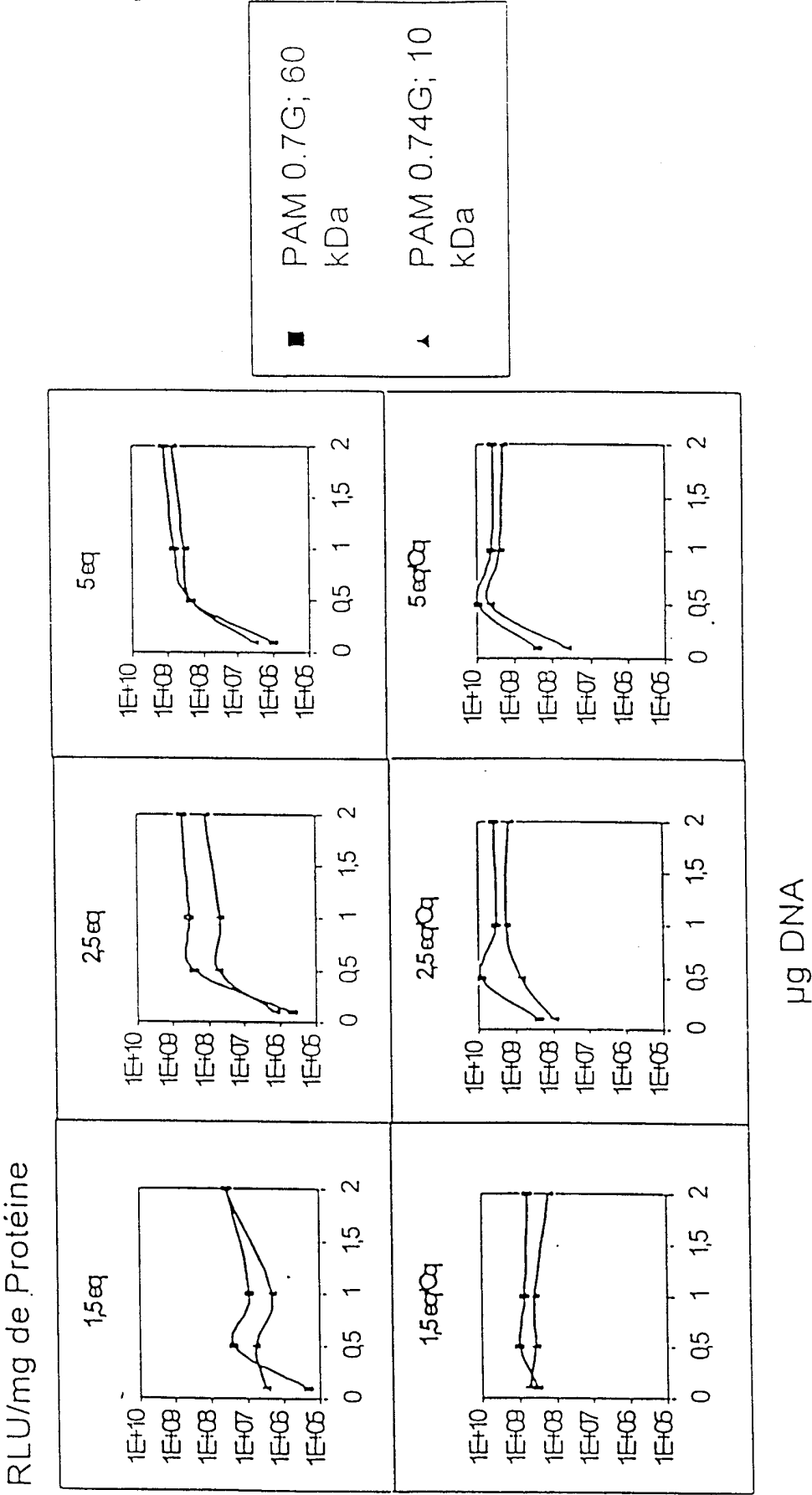


FIGURE 12

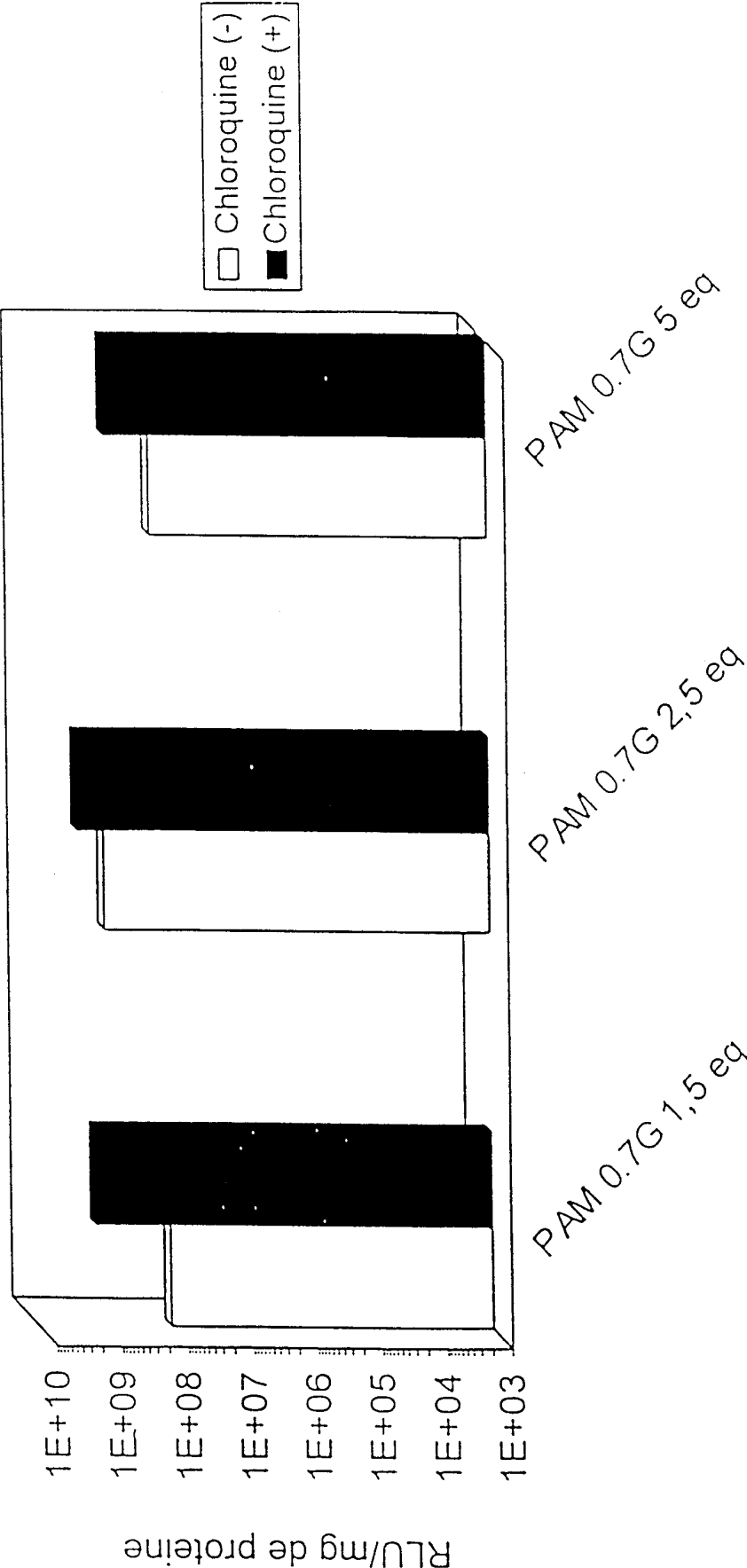
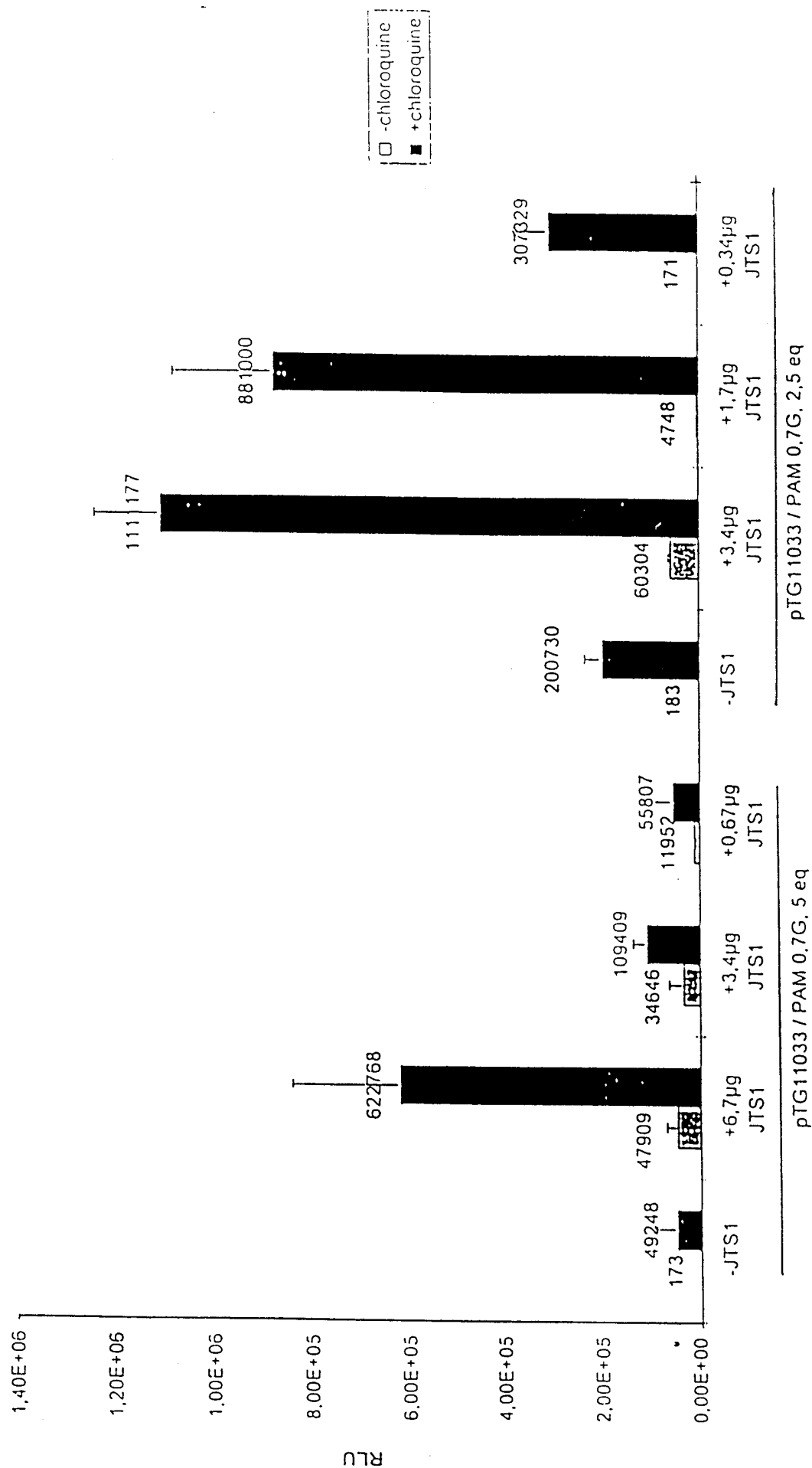


FIGURE 13



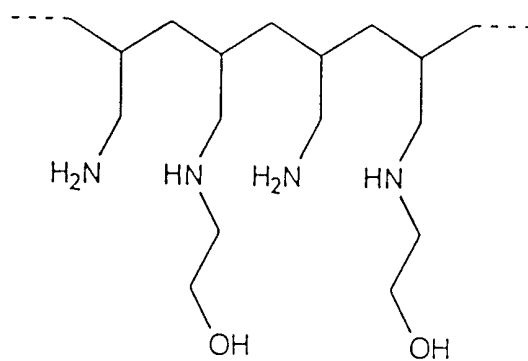


FIGURE 14

FIGURE 15

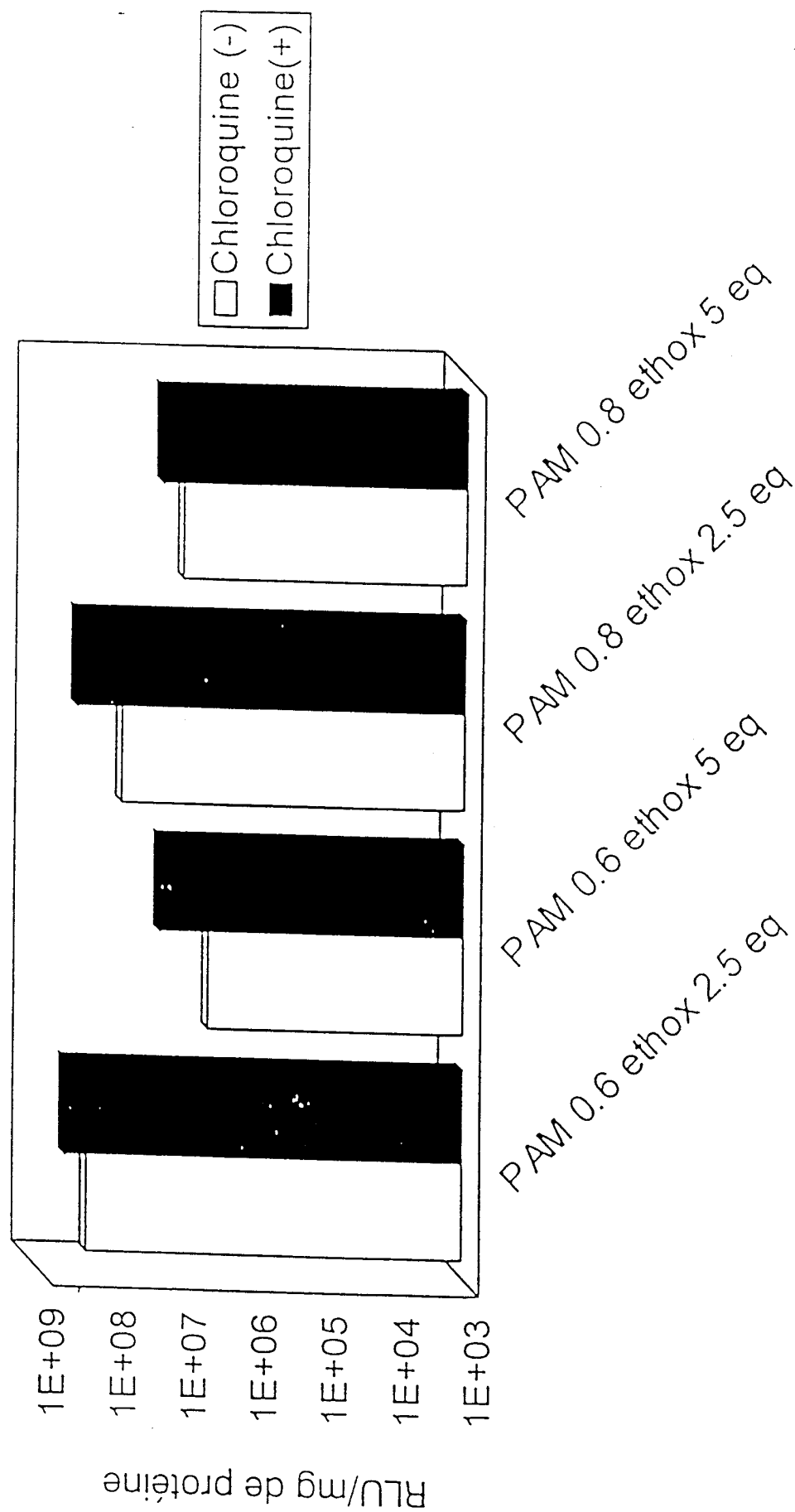


FIGURE 16

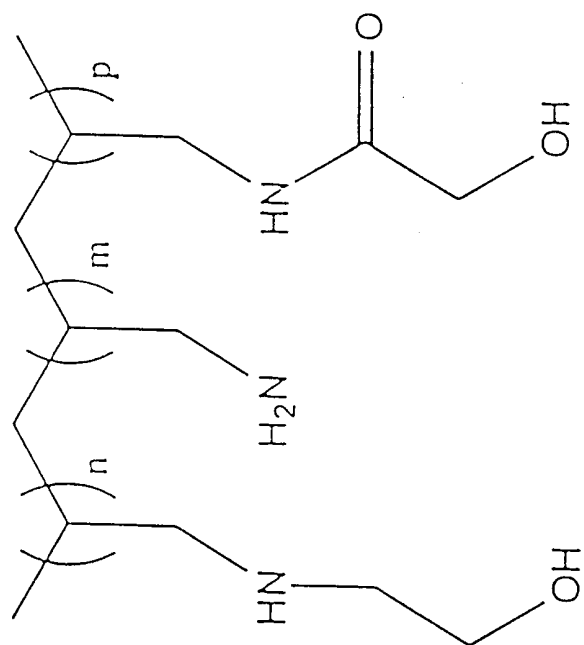
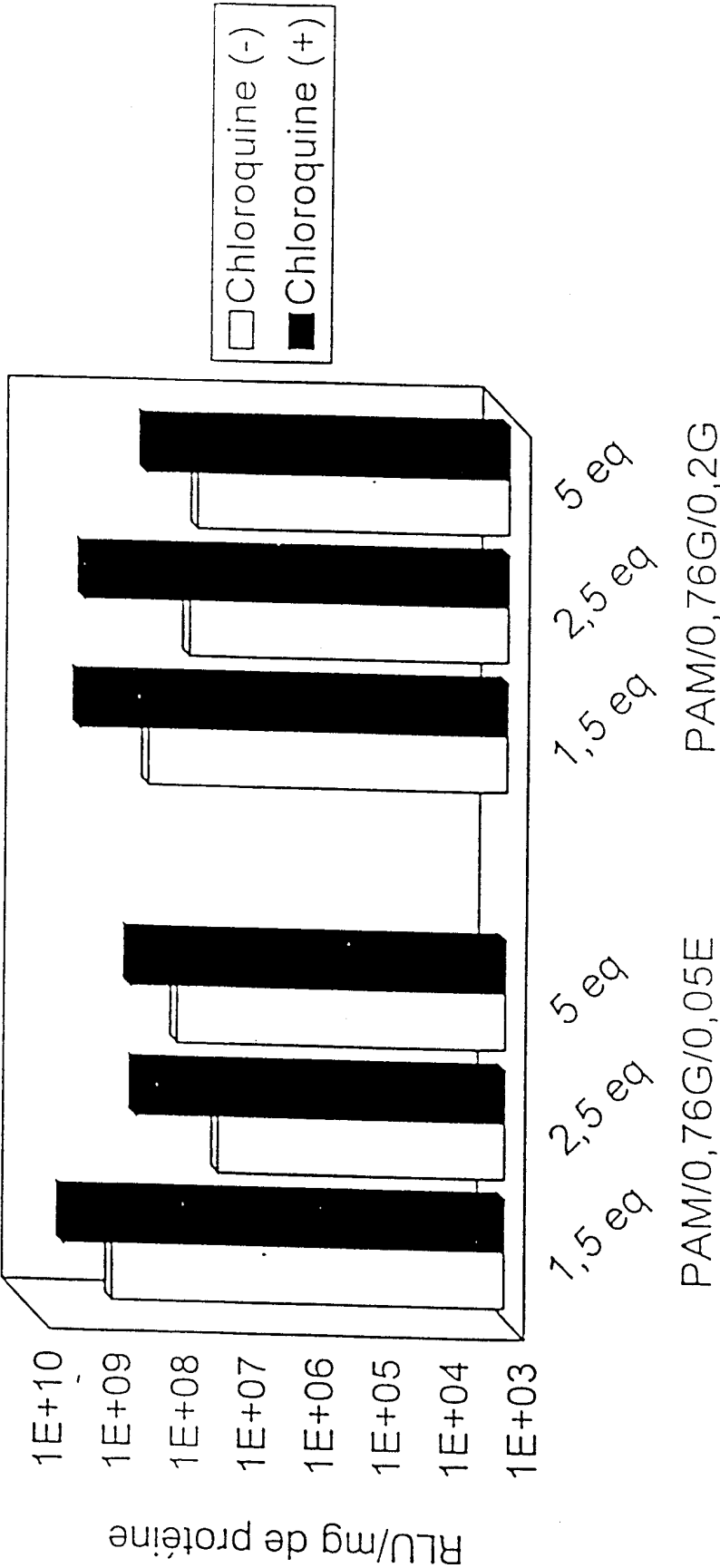
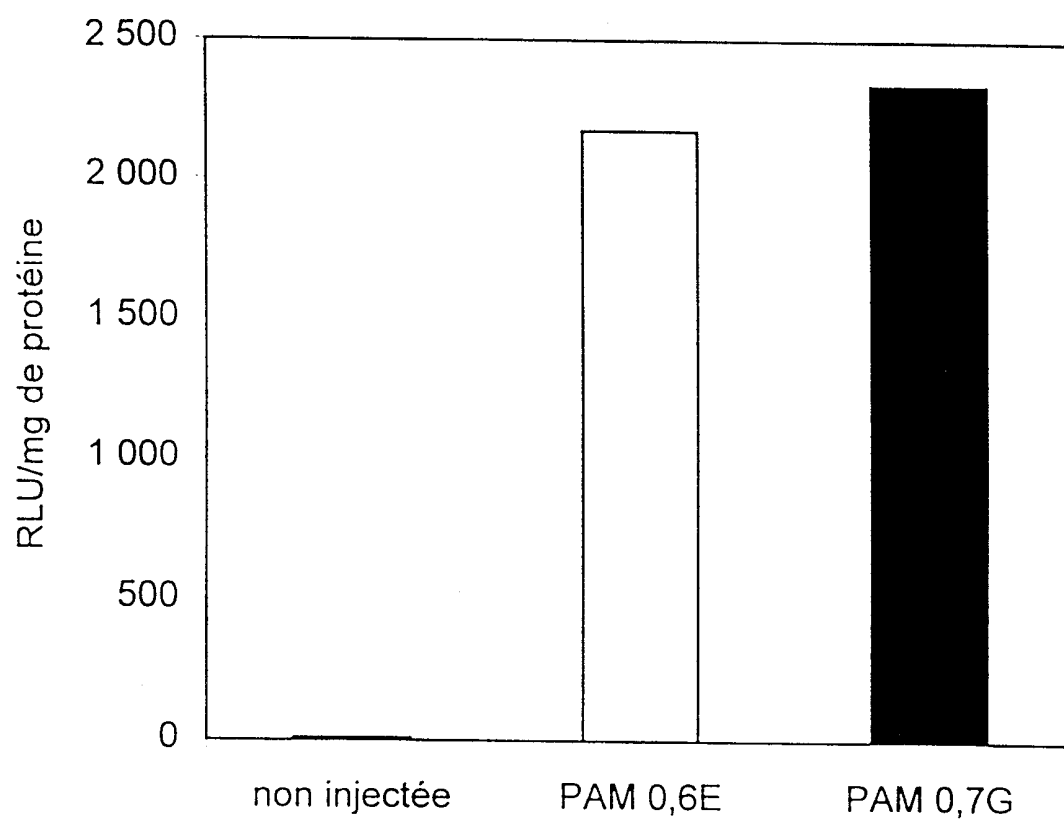


Figure 17



18/18

FIGURE 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C08F8/00 C08G81/02 A61K47/48

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 6 C08F C08G 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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 580 078 A (HOECHST AG) 26 January 1994 see page 3, line 1 - line 55 see page 12, line 5 - page 13, line 55; claims 1-18 ---	1-31
X	EP 0 580 079 A (HOECHST AG) 26 January 1994 see page 2, line 1 - line 53 see page 9, line 50 - page 10, line 52; claims 1-11 ---	1-31
Y	WO 92 07023 A (BEROL NOBEL AB) 30 April 1992 see claims 1-6 ---	1-31
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ 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

16 November 1998

Date of mailing of the international search report

25/11/1998

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Permentier, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 98/01581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 03356 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2 February 1995 see claims 1-42 ----	1-31
Y	EP 0 359 996 A (BIO-POLYMERS, INC.) 28 March 1990 see claims 1-26 ----	1-31
Y	US 5 260 385 A (KOKORO IIO) 9 November 1993 see column 3, line 11 - line 16; claims 1-4 ----	1-31
A	DE 42 27 019 A (K. E. GECKELER) 17 February 1994 see claims 1-6 ----	1
A	EP 0 154 742 A (NITTO BOSEKI CO., LTD.) 18 September 1985 see page 1, line 1 - line 5; claims 1-7 ----	1
A	EP 0 591 807 A (BAYER AG) 13 April 1994 see page 5, line 33 - line 52; claims 1-8 ----	1
A	US 3 440 320 A (R. R. SACKLER) 22 April 1969 see claims 1-16 ----	1
A	US 3 325 472 A (R. R. SACKLER) 13 June 1967 see claims 1-16 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01581

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 580078	A	26-01-1994	AT 159262 T	15-11-1997
			AU 673479 B	07-11-1996
			AU 1353195 A	25-05-1995
			AU 4209093 A	27-01-1994
			CA 2101011 A	23-01-1994
			DE 59307535 D	20-11-1997
			DK 580078 T	25-05-1998
			ES 2110543 T	16-02-1998
			FI 933273 A	23-01-1994
			GR 3025321 T	27-02-1998
			IL 106420 A	10-01-1997
			JP 6166728 A	14-06-1994
			NO 932634 A	24-01-1994
			NZ 248192 A	26-05-1995
			US 5430110 A	04-07-1995
			ZA 9305266 A	10-02-1994
EP 580079	A	26-01-1994	AT 146193 T	15-12-1996
			AU 4208993 A	27-01-1994
			CA 2101010 A	23-01-1994
			DE 59304725 D	23-01-1997
			DK 580079 T	30-06-1997
			ES 2096150 T	01-03-1997
			FI 933274 A	23-01-1994
			GR 3022135 T	31-03-1997
			IL 106421 A	14-11-1996
			JP 6157671 A	07-06-1994
			NO 932635 A	24-01-1994
			NZ 248193 A	27-04-1995
			US 5428112 A	27-06-1995
			US 5631326 A	20-05-1997
			ZA 9305267 A	18-04-1994
WO 9207023	A	30-04-1992	SE 467309 B	29-06-1992
			AU 8749491 A	20-05-1992
			EP 0554324 A	11-08-1993
			JP 6502201 T	10-03-1994
			SE 9003364 A	23-04-1992
			US 5240994 A	31-08-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01581

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9503356 A	02-02-1995	US 5565215 A US 5543158 A US 5578325 A CA 2167920 A CA 2167921 A EP 0710261 A EP 0712421 A JP 9504308 T JP 9504042 T WO 9503357 A	15-10-1996 06-08-1996 26-11-1996 02-02-1995 02-02-1995 08-05-1996 22-05-1996 28-04-1997 22-04-1997 02-02-1995
EP 359996 A	28-03-1990	US 4908404 A AU 618834 B AU 4001489 A CN 1042162 A DE 68914559 D DE 68914559 T DK 410889 A FI 893854 A JP 2191629 A NO 175006 B	13-03-1990 09-01-1992 22-02-1990 16-05-1990 19-05-1994 27-10-1994 23-02-1990 23-02-1990 27-07-1990 09-05-1994
US 5260385 A	09-11-1993	NONE	
DE 4227019 A	17-02-1994	NONE	
EP 154742 A	18-09-1985	JP 1026362 B JP 1541207 C JP 60106804 A AU 553717 B AU 3542084 A CA 1233933 A US 4604451 A US 4687817 A	23-05-1989 31-01-1990 12-06-1985 24-07-1986 23-05-1985 08-03-1988 05-08-1986 18-08-1987
EP 591807 A	13-04-1994	DE 4322884 A JP 6199930 A US 5453461 A	14-04-1994 19-07-1994 26-09-1995
US 3440320 A	22-04-1969	BE 665409 A	14-12-1965

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01581

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3440320 A		DE 1645283 A	29-10-1970
		FR 6802 M	24-03-1969
		FR 1472041 A	24-05-1967
		LU 48859 A	16-12-1965
		NL 6507808 A	20-12-1965
		US 3325472 A	13-06-1967

US 3325472 A	13-06-1967	BE 665409 A	14-12-1965
		DE 1645283 A	29-10-1970
		FR 6802 M	24-03-1969
		FR 1472041 A	24-05-1967
		LU 48859 A	16-12-1965
		NL 6507808 A	20-12-1965
		US 3440320 A	22-04-1969

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 98/01581

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C08F8/00 C08G81/02 A61K47/48

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 6 C08F C08G 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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 580 078 A (HOECHST AG) 26 janvier 1994 voir page 3, ligne 1 - ligne 55 voir page 12, ligne 5 - page 13, ligne 55; revendications 1-18 ---	1-31
X	EP 0 580 079 A (HOECHST AG) 26 janvier 1994 voir page 2, ligne 1 - ligne 53 voir page 9, ligne 50 - page 10, ligne 52; revendications 1-11 ---	1-31
Y	WO 92 07023 A (BEROL NOBEL AB) 30 avril 1992 voir revendications 1-6 ---	1-31
	--- -/--	

☒ 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 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'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 internationale a été effectivement achevée

16 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/11/1998

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Permentier, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No

PCT/FR 98/01581

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 95 03356 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2 février 1995 voir revendications 1-42 ----	1-31
Y	EP 0 359 996 A (BIO-POLYMERS, INC.) 28 mars 1990 voir revendications 1-26 ----	1-31
Y	US 5 260 385 A (KOKORO IIO) 9 novembre 1993 voir colonne 3, ligne 11 - ligne 16; revendications 1-4 ----	1-31
A	DE 42 27 019 A (K. E. GECKELER) 17 février 1994 voir revendications 1-6 ----	1
A	EP 0 154 742 A (NITTO BOSEKI CO., LTD.) 18 septembre 1985 voir page 1, ligne 1 - ligne 5; revendications 1-7 ----	1
A	EP 0 591 807 A (BAYER AG) 13 avril 1994 voir page 5, ligne 33 - ligne 52; revendications 1-8 ----	1
A	US 3 440 320 A (R. R. SACKLER) 22 avril 1969 voir revendications 1-16 ----	1
A	US 3 325 472 A (R. R. SACKLER) 13 juin 1967 voir revendications 1-16 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der e internationale No

PCT/FR 98/01581

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 580078 A	26-01-1994	AT 159262 T	15-11-1997
		AU 673479 B	07-11-1996
		AU 1353195 A	25-05-1995
		AU 4209093 A	27-01-1994
		CA 2101011 A	23-01-1994
		DE 59307535 D	20-11-1997
		DK 580078 T	25-05-1998
		ES 2110543 T	16-02-1998
		FI 933273 A	23-01-1994
		GR 3025321 T	27-02-1998
		IL 106420 A	10-01-1997
		JP 6166728 A	14-06-1994
		NO 932634 A	24-01-1994
		NZ 248192 A	26-05-1995
		US 5430110 A	04-07-1995
		ZA 9305266 A	10-02-1994
EP 580079 A	26-01-1994	AT 146193 T	15-12-1996
		AU 4208993 A	27-01-1994
		CA 2101010 A	23-01-1994
		DE 59304725 D	23-01-1997
		DK 580079 T	30-06-1997
		ES 2096150 T	01-03-1997
		FI 933274 A	23-01-1994
		GR 3022135 T	31-03-1997
		IL 106421 A	14-11-1996
		JP 6157671 A	07-06-1994
		NO 932635 A	24-01-1994
		NZ 248193 A	27-04-1995
		US 5428112 A	27-06-1995
		US 5631326 A	20-05-1997
		ZA 9305267 A	18-04-1994
WO 9207023 A	30-04-1992	SE 467309 B	29-06-1992
		AU 8749491 A	20-05-1992
		EP 0554324 A	11-08-1993
		JP 6502201 T	10-03-1994
		SE 9003364 A	23-04-1992
		US 5240994 A	31-08-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den e Internationale No

PCT/FR 98/01581

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9503356 A	02-02-1995	US 5565215 A US 5543158 A US 5578325 A CA 2167920 A CA 2167921 A EP 0710261 A EP 0712421 A JP 9504308 T JP 9504042 T WO 9503357 A	15-10-1996 06-08-1996 26-11-1996 02-02-1995 02-02-1995 08-05-1996 22-05-1996 28-04-1997 22-04-1997 02-02-1995
EP 359996 A	28-03-1990	US 4908404 A AU 618834 B AU 4001489 A CN 1042162 A DE 68914559 D DE 68914559 T DK 410889 A FI 893854 A JP 2191629 A NO 175006 B	13-03-1990 09-01-1992 22-02-1990 16-05-1990 19-05-1994 27-10-1994 23-02-1990 23-02-1990 27-07-1990 09-05-1994
US 5260385 A	09-11-1993	AUCUN	
DE 4227019 A	17-02-1994	AUCUN	
EP 154742 A	18-09-1985	JP 1026362 B JP 1541207 C JP 60106804 A AU 553717 B AU 3542084 A CA 1233933 A US 4604451 A US 4687817 A	23-05-1989 31-01-1990 12-06-1985 24-07-1986 23-05-1985 08-03-1988 05-08-1986 18-08-1987
EP 591807 A	13-04-1994	DE 4322884 A JP 6199930 A US 5453461 A	14-04-1994 19-07-1994 26-09-1995
US 3440320 A	22-04-1969	BE 665409 A	14-12-1965

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. Internationale No

PCT/FR 98/01581

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3440320 A		DE 1645283 A	29-10-1970
		FR 6802 M	24-03-1969
		FR 1472041 A	24-05-1967
		LU 48859 A	16-12-1965
		NL 6507808 A	20-12-1965
		US 3325472 A	13-06-1967
US 3325472 A	13-06-1967	BE 665409 A	14-12-1965
		DE 1645283 A	29-10-1970
		FR 6802 M	24-03-1969
		FR 1472041 A	24-05-1967
		LU 48859 A	16-12-1965
		NL 6507808 A	20-12-1965
		US 3440320 A	22-04-1969