



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

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 48/00, C12N 5/10, A61P 25/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/37111 (43) Date de publication internationale: 29 juin 2000 (29.06.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02964 (22) Date de dépôt international: 30 novembre 1999 (30.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/16144 21 décembre 1998 (21.12.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): NEUROTECH (S.A.) [FR/FR]; Parc Club Orsay, 2, rue Jean Rostand, Bâtiment D, F-91893 Orsay (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TIMSIT, Serge [FR/FR]; 112 Ter, avenue de Suffren, F-75015 Paris (FR). QUINONERO, Jérôme [FR/FR]; 5, cours du Lizard, F-77186 Noisiel (FR). (74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: MAMMALIAN CELL PREPARATIONS OPTIONALLY TRANSFECTED WITH A GENE CODING FOR AN ACTIVE SUBSTANCE CONTAINING SAME (54) Titre: PREPARATIONS DE CELLULES DE MAMMIFERE EVENTUELLEMENT TRANSFECTEES AVEC UN GENE CODANT POUR UNE SUBSTANCE ACTIVE ET LES CONTENANT (57) Abstract <p>The invention concerns a mammalian cell preparation optionally transfected with at least a gene coding for an active substance capable of being administered to a subject by systemic administration. The invention is characterised in that it does not comprise aggregate of said cells having a size likely to cause temporary or permanent dysfunction in the subject. The invention also concerns pharmaceutical compositions comprising said preparation and an acceptable carrier.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet une préparation de cellules de mammifère éventuellement transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents. L'invention concerne aussi les compositions pharmaceutiques comprenant une telle préparation et un véhicule acceptable.</p>		

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						

PREPARATIONS DE CELLULES DE MAMMIFERE EVENTUELLEMENT TRANSFECTEES AVEC UN GENE CODANT POUR UNE SUBSTANCE ACTIVE ET LES CONTENANT

5 La présente invention concerne la
préparation de cellules de mammifères génétiquement
modifiées utiles tant comme modèle pour la recherche que
pour le diagnostic ou la thérapie génique plus
particulièrement pour le traitement des maladies du
10 système nerveux cérébral chez l'homme et éventuellement
l'animal.

 Parmi les nouveaux traitements des maladies
humaines, la thérapie génique, c'est-à-dire la
15 correction *in vivo* du phénotype d'une maladie à travers
l'utilisation d'un gène fonctionnel comme agent
pharmacologique, est en plein essor. Schématiquement,
deux types de stratégie de thérapie génique peuvent être
distingués :

20 - Une stratégie dite *in vivo*, où le gène
d'intérêt est administré directement dans les cellules
de l'hôte.

 - Une stratégie dite *ex vivo* ou de thérapie
génique cellulaire, consistant à prélever et mettre en
25 culture des cellules choisies comme vecteur, à
transférer *in vitro* un ou plusieurs gènes, aussi
désignés transgènes, dans ces cellules, puis à implanter
des cellules génétiquement modifiées.

30 La thérapie génique cellulaire présente des
atouts indéniables comme la possibilité de pouvoir
vérifier, *in vitro*, préalablement à la greffe, les
effets de l'introduction et de l'expression du transgène
sur le phénotype des cellules modifiées, le nombre de
35 copies du transgène, son taux de transcription, la

quantité de protéine produite et l'effet biologique de celle-ci. La population cellulaire à greffer peut être purifiée afin d'introduire un greffon homogène tant du point de vue phénotypique, que de la production de la protéine désirée.

Parmi les cellules utilisées en thérapie génique cellulaire, il a été proposé dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO93/13807 d'administrer par voie intraveineuse des cellules endothéliales non immortalisées génétiquement modifiées pour exprimer au niveau de sites angiogéniques des produits thérapeutiques.

Toutefois, il convient de rappeler que toutes les cellules endothéliales ne sont pas identiques. En effet, les cellules endothéliales de l'adulte forment une population cellulaire très hétérogène, non seulement entre les organes, mais aussi, dans un même organe, entre les vaisseaux de divers calibres. L'hétérogénéité endothéliale se caractérise par des différences morphologiques mais aussi par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques à une ou des populations de cellules endothéliales. Par exemple dans le système nerveux central (SNC), les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux forment, en association avec les cellules astrocytaires du parenchyme cérébral, la barrière hémato-encéphalique (BHE).

La mise au point de préparation de cellules de mammifère pour la thérapie génique présente donc un problème quant à l'homogénéité et à la caractérisation desdites cellules. Une solution efficace à ce problème consiste à immortaliser les cellules. On a ainsi décrit dans l'art antérieur des lignées de cellules endothéliales cérébrales ou encore de cellules

endothéliales et épithéliales rétiniennes de mammifères immortalisées portant éventuellement un transgène utiles pour le traitement des maladies neurologiques y compris les tumeurs. On peut citer tout particulièrement les travaux de la Demanderesse rapportés dans les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les numéros 5 WO96/11278 et WO97/40139.

Les travaux de recherche réalisée par la demanderesse sur l'immortalisation de cellules de mammifère, plus particulièrement endothéliales cérébrales, lui ont permis d'obtenir une quantité importante, homogène et parfaitement caractérisée, de matériel à greffer ou à injecter permettant la mise en œuvre d'un procédé efficace de thérapie génique d'une 15 maladie chez un patient. Ainsi, il a été mis en évidence dans le cadre de la présente invention, qu'après avoir été injectées dans le compartiment sanguin irriguant le SNC, les cellules endothéliales cérébrales immortalisées génétiquement modifiées, comme les cellules RBE4 20 n'exprimant pas de transgène, les cellules RBEZ et RBE4/GFP exprimant un transgène, sont capables de survivre et de s'intégrer dans la paroi vasculaire des micro-vaisseaux cérébraux, ainsi que dans le parenchyme cérébrale. La démonstration de l'intérêt de cette 25 approche a demandé une maîtrise technique tant dans la mise au point des préparations cellulaires et des compositions les contenant qui ont été injectées, que dans les modes opératoires de l'injection.

30 En effet, les travaux de la Demanderesse concernant l'injection des cellules à des animaux lui ont permis de mettre en évidence l'effet délétère de la présence d'aggrégats cellulaires dans les compositions injectées, comme par exemple des accidents vasculaires 35 cérébraux ou des embolies pulmonaires. Or, de manière

surprenante, l'effet délétère induit par la présence de ces agrégats cellulaires lors de l'injection ne semble pas avoir été envisagé jusqu'à ce jour. Pourtant, on a proposé dans l'art antérieur d'injecter des particules
5 conjugués ou non a un agent actif pour réaliser un diagnostic ou une thérapie. On peut citer par exemple les travaux réalisés sur des microsphères synthétiques de tailles bien définies ci-après:

- l'injection de sphères de 75 à 150 microns
10 dans les vaisseaux du coeur provoque une nécrose myocardique (Battler et al., 1993, J. Am. Coll. Cardiol., 22: 2001-2006),

- l'injection de sphères de 7 microns dans
15 les artères de cochon, à raison de 105 particules par gramme de myocarde, ne provoque pas d'effets délétères sur le tissu myocardique (Arras et al., 1998, Nature Biotechnology, 16: 159-162),

- l'injection de microsphères de 48 microns
20 de diamètre (900 microsphères) dans la carotide interne droite provoque des infarctus cérébraux dans le cortex pariéto-temporal, le corps calleux, l'hippocampe, le thalamus et le noyau lenticulaire (Miyake et al., 1993, Stroke, 24: 415-420).

On a également décrit l'injection chez
25 l'homme de microsphères d'albumines radiomarquées, d'une taille de 15 à 30 microns, dans les artères carotides commune ou interne pour détecter des régions infarctées du cerveau par des techniques de tomo-scintigraphie cérébrales (Verhas et al., 1976, J. Nucl. Med., 17: 170-
30 174) sans qu'aucun effet délétère n'ait été rapporté.

Dans le domaine de la circulation
extracorporelle (CEC) où les particules générés sont
susceptible d'avoir un effet délétère sur l'organisme,
il a été proposé d'utiliser des filtres de 20 microns
35 pour diminuer de 90% le nombre de particules

potentiellement délétères (Loop et al., 1976, Ann. Thorac. Surg., 21: 412-420).

5 Or, comme indiqué précédemment, les rares travaux de l'art antérieur concernant l'injection de cellules notamment endothéliales ne rapporte pas d'effets délétères des compositions cellulaires injectées dus à la présence d'agrégats cellulaires. Ainsi, la demande de brevet internationale PCT 10 WO93/13807 décrit l'injection intraveineuse de 2×10^6 cellules endothéliales non immortalisée par la veine de la queue de souris, et ne mentionne pas l'observation d'effet délétère lié à la formation d'agrégats cellulaires (Ojeifo et al., 1995, Cancer Res., 55: 2240-15 2244). Dans l'hypothèse ou effectivement aucun effet délétère n'a été observé, il est vraisemblable que le faible nombre de cellules injectées chez une souris de 30 g, de l'ordre de 2×10^6 , soit 2 fois moins que ce qui est réalisé dans le cadre de la présente invention chez un rat de 300 g, n'induit pas d'effet délétère malgré 20 la formation d'agrégats cellulaires.

De même, les auteurs des travaux concernant l'injection intra-artérielle (intra-fémorale) de 1 à 2×10^6 cellules endothéliales non immortalisée dans le 25 membre inférieur de rat, ne rapportent pas l'observation d'effet délétère et ne suggère pas le problème de la formation d'agrégats (Messina et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 12018-12022). Bien que ces travaux ne s'intéresse pas aux effets délétères provoqués par 30 l'injection, il convient de remarquer que le nombre de cellules injectées est faible, de l'ordre de 50 fois moins que ce qui est réalisé dans le cadre de la présente invention. En outre, la cible concernée par ces travaux est les vaisseaux du membre inférieur, dont la 35 tolérance à l'ischémie est plus grande que d'autres

organes. D'ailleurs, il est indiqué que les expérimentateurs ont clampé pendant une heure l'artère fémorale pour permettre une diminution du débit sanguin et ainsi favoriser l'adhésion des cellules aux parois vasculaires.

Le but de la présente invention est donc d'offrir une solution efficace et simple permettant d'éviter les effets délétères des injections de préparations cellulaires, et ainsi de développer leur application en médecine humaine.

Ce but est atteint grâce à une préparation de cellules immortalisées de mammifère éventuellement transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents.

De préférence, les cellules immortalisées sont non tumorigènes.

Les préparations de l'invention peuvent alors contenir un grand nombre de cellules, de l'ordre de 1 000 à 300 000 cellules par microlitre, permettant d'obtenir un effet biologique, en diagnostic ou thérapeutique, efficace sans induire d'effet délétère pouvant provoquer une diminution transitoire ou permanente de l'apport sanguin d'un organe, du type embolie pulmonaire, accident ischémique cérébral, ischémie périphérique voire la mort.

Les essais réalisés dans le cadre de l'invention ont permis de caractériser la taille des agrégats susceptibles d'induire des effets délétère lors de l'injection systémique de composition contenant les cellules. Ainsi, de façon avantageuse, une préparation

de l'invention ne comprend pas d'agrégat de cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns.

5 Tous type de cellules, immortalisées ou non, peuvent entrer dans la constitution des préparations de l'invention, comme des cellules de l'endoderme, de l'épiderme ou du mésoderme, telles que cellules endothéliales cérébrales ou périphériques et leur
10 progéniteur, les cellules des plexus choroïdes, les cellules épithéliales, les cellules rétiniennes pigmentaires, les épendymocytes, les tancocytes, les cellules souches et progénitrices neurales, ou encore même les cellules souches embryonnaires.

15 Parmi celles-ci, l'invention concerne plus particulièrement les cellules endothéliales et les cellules épithéliales de mammifères, avantageusement cérébrales ou rétiniennes.

20 L'immortalisation des cellules peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, comme celles décrites dans les demandes de brevet PCT publiées sous les numéros WO96/11278 et WO97/40139. On préfère tout particulièrement dans le cadre de l'invention des cellules immortalisées car celles-ci
25 présentent l'avantage de la standardisation de production en grande quantité avec des critères élevés de qualité. Les cellules immortalisées présentent un caractère non tumorigène obtenu par toute méthode connue de l'homme du métier comme celles décrites dans les
30 demandes PCT citées ci-dessus.

35 L'absence d'agrégat cellulaire susceptible d'entraîner des dysfonctionnements transitoires ou permanents chez les sujets ayant reçu une préparation de l'invention, peut être obtenue par tout traitement

biologique, chimique ou physique des cellules empêchant la formation d'agrégat ou supprimant spécifiquement les agrégats desdites cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns. Après ce traitement les cellules sont avantagement mises en suspension dans un milieu permettant leur survie et ne favorisant pas leur ré-agrégation. Un tel milieu est par exemple tout milieu nutritif ne favorisant pas l'agrégation comme du PBS glucose sans calcium ni magnésium.

Un traitement biologique des cellules selon l'invention consiste par exemple à sélectionner des cellules endothéliales pour des critères particuliers d'adhésion ou à modifier génétiquement les dites cellules par une séquence d'acide nucléique exprimant un agent empêchant la formation d'agrégat ou inhibant l'expression d'un agent favorisant la formation d'agrégat desdites cellules.

Deux approches peuvent ainsi être mises en œuvre :

- la délétion de séquences codant pour des molécules d'adhésion telles que : Z01, Z02, E-selectine, V.E. Cadherine, ICAM-1, occludine, P-CAM, etc ..., ou
- l'introduction de séquences codant pour des molécules empêchant la formation d'agrégats, telles que des dominants négatifs des molécules d'adhésion citées ci-dessus ou codant pour des protéines leurres.

Un traitement physique des cellules selon l'invention consiste par exemple en une filtration ou un tamisage. Outre, l'exclusion d'agrégat, cette filtration ou tamisage offre l'avantage de disposer d'une population de cellules de taille homogène. Cette filtration ou tamisage est conduit de la façon suivante : Les cellules sont filtrées à l'aide de

5 filtres de blutage d'avantageusement 30 microns, puis
diluées et dissociées avec douceur par exemple par
pipetage multiple, et la suspension cellulaire est
ensuite aspirée dans une seringue. Le filtre a été
10 trempé au préalable dans du sérum physiologique stérile
puis désinfecté dans l'alcool à 100°, séché à l'air,
retrempé dans du sérum physiologique stérile. Le filtre
est ensuite placé entre l'aiguille et l'embout de la
seringue contenant les cellules. Le piston est poussé
10 délicatement de manière à avoir un écoulement goutte à
goutte des cellules diluées.

 Mais un traitement physique peut aussi être
constitué par un tri de type FACS "Fluorescent Analysis
Cell Sorting".

15 Un traitement chimique des cellules selon
l'invention consiste par exemple à trypsiniser les
cellules ou à les soumettre à l'action d'une autre
protéase.

20 Les cellules des préparations selon
l'invention peuvent ou non être transfectées avec un ou
plusieurs gènes codant pour une substance active qui est
utile pour la thérapie ou le diagnostic. On entend au
sens de la présente invention, par transfection avec un
25 ou plusieurs gènes codant pour une substance active, la
transfection des cellules par un fragment d'acide
nucléique, comme un vecteur d'expression, intégré dans
le génome ou présent dans le cytoplasme des cellules, et
capable de permettre l'expression de polypeptide(s),
30 protéine(s) ou vecteur viral constituant directement ou
indirectement une substance active. A titre d'exemples,
on peut citer les cellules endothéliales cérébrales
immortalisées transfectées avec un gène codant pour une
substance active des compositions décrite dans la
35 demande de brevet internationale PCT WO96/11278 dont

l'enseignement est intégré à la présente demande par référence.

L'invention se rapporte aussi à
5 l'utilisation des préparations cellulaires précédentes pour la préparation d'un médicament destiné au diagnostic ou au traitement par thérapie génique d'une maladie chez un patient par administration par voie systémique d'une quantité suffisante desdites cellules.

10 L'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation de cellules comme décrite précédemment, en association dans ladite
15 composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable permettant la survie desdites cellules et ne favorisant pas leur ré-agrégation. On entend par composition pharmaceutique tant des compositions thérapeutique que de diagnostic.

20 La taille des agrégats qui ne sont pas susceptibles d'induire, lors de l'injection des compositions de l'invention chez un patient, des dysfonctionnements transitoires ou permanents sont
25 fonction de la voie d'administration. Ainsi, les injections artérielles sélective par organe vont directement dans ledit organe sans passer préalablement par un organe filtrant comme le poumon. En conséquence, pour une administration intra-artérielle, la taille
30 tolérée des agrégats est plus basse que pour une injection intra-veineuse. En effet, après injection dans une veine du pli du coude, le filtre pulmonaire peut agir et limiter la présence d'agrégats dans les autres organes. Toutefois, le risque d'effet délétère lors
35 d'une injection intra-veineuse existe puisque la

Demanderesse a observé la mort d'animaux, probablement par embolie pulmonaire, lors de l'injection de cellules endothéliales n'ayant pas subies une filtration préalable.

5 En outre, une interprétation des données de l'art antérieur et les expériences réalisées par la Demanderesse, semblent indiquer que des sphères d'une taille de plus de 40 microns sont susceptibles de présenter un effet délétère sur les tissus cibles par
10 voie intra-artérielle. En conséquence, si l'on considère qu'un amas de cellules, par exemple endothéliales, se comporte comme une sphère, il est recommandé selon l'invention d'éliminer les agrégats de taille supérieure à 30 microns. Néanmoins, les critères physiques de
15 déformabilité des cellules dans un micro-vaisseaux sont différents de ceux d'une particules synthétiques, et ce paramètre doit être pris en compte lors des traitements de cellules, comme par exemple en filtration, où l'utilisation d'un filtre de 30 microns permet
20 d'éliminer au maximum les agrégats de plus de 30 microns et, en conséquence, les cellules restantes, au moins 90%, sont des cellules isolées, dont le diamètre moyen, par exemple d'une cellule endothéliale, est de 10 microns.

25 En conséquence, l'invention concerne plus particulièrement :

 - d'une part une composition pour être administrée par voie intra-artérielle, avantageusement intra-carotidienne, chez un patient, caractérisée en ce
30 qu'elle comprend une préparation de cellules ne comprenant pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à 50 microns et de préférence supérieure à 30 microns, et

 - d'autre part, une composition pour être
35 administrée par voie intra-veineuse, chez un sujet,

caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation de cellules ne comprenant pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à 200 microns et de préférence supérieure à 100 microns.

5

Ces deux voies d'administration sont à prendre en considération pour la sélection des cellules injectées vers l'organe ou le tissu visé. Il est en effet recommandé de cibler un organe en injectant les compositions de l'invention dans l'artère irriguant directement l'organe ciblé.

10

A l'inverse, l'injection desdites compositions par voie intra-veineuse, nécessite d'avoir sélectionné ou conféré aux cellules des propriétés particulières leur permettant de cibler l'organe ou le tissu visé. Il peut s'agir par exemple d'une sélection de cellules endothéliales présentant des propriétés d'adhésion spécifiques ou d'une modification génique lui conférant les propriétés requises de l'organe cible.

15

20

La voie d'injection intra-artérielle, de préférence intra-carotidienne pour des applications rapportant au SNC, constitue un mode de mise en oeuvre préférée des compositions de l'invention. En effet, bien que l'injection par voie systémique semble la plus adéquate car elle permet une biodistribution la plus large possible, l'analyse de ce paramètre par la Demanderesse pour optimiser le procédé de thérapie génique mettant en oeuvre les compositions de l'invention a conduit à retenir tout préférentiellement le réseau vasculaire carotidien, qui est la voie sanguine la plus proche du SNC. Ce réseau apporte 80 % du débit sanguin cérébral nécessaire chez l'homme au bon fonctionnement du SNC et est accessible en clinique humaine mais aussi à l'expérimentateur animal.

30

35

Ainsi, la Demanderesse a montré dans le cadre de la présente invention que l'injection de cellules endothéliales dans la carotide est faisable en respectant le débit sanguin. Le choix de cette voie
5 d'administration permet de minimiser au maximum les modifications du flux sanguin cérébral. En effet, le flux dans la carotide interne n'est jamais interrompu au cours de cette procédure. De plus, les analyses menées sur des animaux contrôles n'ont montré aucune atteinte
10 parenchymateuse. Chez le rat, l'injection se fait dans la circulation carotidienne générale et se répartit à tout le territoire concerné. Chez l'homme, il est possible par les techniques de neuroradiologie interventionnelle d'injecter à l'aide d'un cathéter des vaisseaux plus petits, tels que l'artère cérébrale
15 moyenne, l'artère cérébrale antérieure ou l'artère cérébrale postérieure voire des branches de ces artères et donc d'obtenir potentiellement un meilleur ciblage et un effet délétère moindre. Bien entendu, ces techniques sont invasives, mais elles ne le sont
20 néanmoins pas plus qu'une artériographie qui requiert les mêmes procédures. Elles sont en revanche bien moins invasives que les gestes d'injections intraventriculaires ou intracérébrales qui permettraient la délivrance d'un produit de thérapie génique.
25

Dans certaines conditions, l'injection intra-carotidienne a occasionné une mortalité, et des lésions parenchymateuses. La mortalité était en générale immédiate et associée le plus souvent à des troubles
30 respiratoires. L'explication la plus plausible est que l'injection de cellules provoquaient des embolies pulmonaires mortelles. Les lésions parenchymateuses sont survenues lorsque les quantités de cellules endothéliales étaient élevées et lorsque la suspension
35 cellulaire n'était pas filtrée. Ces données confirment

le concept de la présente l'invention, selon lequel ce sont les agrégats cellulaires qui sont responsables des lésions parenchymateuses cérébrales et de la mortalité puisqu'elles sont minimisées après filtration. Les lésions parenchymateuses cérébrales correspondent le plus probablement à des infarctus cérébraux puisqu'elles apparaissent en hypersignal en T2 et sont localisées au territoire vasculaire de la carotide interne. La filtration a presque permis de faire disparaître tous ces effets délétères, dans de rares cas une dilatation du ventricule latéral était visible du côté de l'injection.

Comme indiqué précédemment l'absence d'agrégats dans les préparations selon l'invention permettent de disposer de compositions comprenant un nombre de cellules supérieur à ce qui était permis dans l'art antérieur. Ainsi, les composition selon l'invention, comprennent de l'ordre de 1 000 à 300 000 cellules par microlitre de composition.

Les composition selon l'invention sont tout particulièrement utiles dans le domaine de la thérapie génique, mais leur utilisation peut aussi être envisagée en matière de diagnostic.

A titre d'exemple d'applications thérapeutiques des composition de l'invention, ont peut citer le traitement et/ou la prévention des maladies neurologiques dégénératives, comme le Parkinson, l'Alzheimer, le Chorée d'Huntington, etc..., des accidents vasculaires cérébraux, des cancers, des affections de l'œil, des maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, des maladies immunologiques, des malformations vasculaires artérielles ou veineuses.

Parmi, les applications thérapeutiques ci-dessus, l'invention concerne plus particulièrement, une composition pharmaceutique pour être administrée par voie systémique, avantageusement intra-artérielle, dans un procédé de thérapie génique d'une maladie du système nerveux central chez un sujet, caractérisée en ce que les cellules de la préparation présente dans ladite composition sont transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active dans le traitement ou la prévention d'une maladie du système nerveux.

On entend par maladie du SNC, tant le SNC lui-même que l'oeil et notamment la rétine, que les vaisseaux le constituant ou l'irriguant. A titre d'exemples de maladies du SNC, on peut citer, les tumeurs cérébrales, les infarctus cérébraux, les maladies neuro-dégénératives comme celles citées précédemment, ou les malformations artério-veineuses ou simplement artérielles telles que les anévrismes artériels ou simplement veineux, les maladies oculaires et en particulier les dégénérescences rétiniennes.

En conséquence, les cellules des compositions de l'inventions sont transfectées avec un gène codant pour une substance active dans le traitement et/ou la prévention des pathologies ci-dessus.

La substance codée par le gène avec lequel les cellules ont été transfectées peut être directement ou indirectement active, c'est à dire nécessiter :

- l'administration au sujet d'une deuxième substance interférant avec la première ou avec le gène codant pour celle-ci, ou
- l'exposition à une source d'énergie, ou
- la transformation par une substance naturellement présente dans l'organisme, pour réaliser l'effet thérapeutique.

On peut citer notamment les substances et les gènes choisis parmi : les facteurs de croissance, les facteurs anti-apoptotiques, les gènes tueurs, les antiprotéases, les immunomodulateurs, les gènes supprimeurs de tumeur, les gènes bloquant le cycle cellulaire, ou tout autre gène ou substance actif connus de l'homme du métier pour être utile dans la prévention ou le traitement des maladies du SNC.

Les compositions de l'invention utiles pour le traitement d'une maladie du SNC sont par exemple dosées de façon à permettre une administration de 1 million à 200 millions de cellules par kilogramme de poids du sujet à traiter.

Pour cette application au SNC, l'invention envisage plus particulièrement des cellules endothéliales cérébrales avantageusement immortalisées.

On connaît en effet la thérapie génique par greffe intracérébrale de cellules génétiquement modifiées qui s'appliquent aux déficits neurologiques dus à une perturbation dans une zone restreinte du système nerveux central. Dans ce mode de traitement, une faible production de molécule thérapeutique, par de petits greffons, peut être capable de rétablir une fonction normale. Pour pouvoir couvrir des territoires plus étendus que ceux atteints par greffe mécanique, directement dans le parenchyme cérébral, l'injection par voie systémique semble la plus adéquate. En effet, la voie sanguine est la voie classique d'administration des substances thérapeutiques. Elle permet une biodistribution la plus large possible. Pour étendre cette approche d'injection à la thérapie génique cellulaire, la cellule endothéliale cérébrale apparaît maintenant comme un moyen de choix.

5 Mais la thérapie génique de maladies du système nerveux central se heurte, en partie, aux problèmes posés par le nombre de types cellulaires différent composant le SNC et surtout par le nombre et la complexité de leurs connexions. De plus, la présence de la barrière hémato-encéphalique, caractéristique du SNC, rend l'accès au cerveau difficile pour le traitement des pathologies du SNC, et complique la conception de nouvelles substances thérapeutiques limitant ainsi l'utilisation de ces substances à des injections intracrâniennes ou intraoculaires.

10 La demanderesse a maintenant mis en évidence que les cellules endothéliales cérébrales sont susceptibles de constituer de bons vecteurs de thérapie génique pour le système nerveux central. En effet, les cellules endothéliales cérébrales composant le réseau vasculaire cérébral sont à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral et forment la barrière hémato-encéphalique caractéristique du système nerveux central. Il a en outre été montré qu'elles sont capables de survivre et de s'implanter dans le système nerveux central après greffe intracérébrale (Quinonéro et al, Gene therapy, 1997, 4, 111-119).

15 Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention, ont permis de montrer à l'aide de trois techniques différentes, coloration bisbenzimidazole et gènes reporter (bêta-galactosidase et GFP) que les cellules endothéliales étaient capables, d'une part de s'intégrer dans les vaisseaux et, d'autre part de survivre au sein du parenchyme en dehors de la lumière des vaisseaux. Ces résultats démontrent donc qu'il est possible d'exprimer un transgène dans le cerveau. Les potentialités thérapeutiques des compositions de l'invention visent donc plus spécifiquement les maladies du système nerveux central. Les maladies plus

particulièrement concernées par cette approche sont les tumeurs cérébrales et les infarctus cérébraux. Les maladies neuro-dégénératives peuvent être aussi concernées et en particulier la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et la maladie de Huntington.

En conséquence, l'invention a tout particulièrement pour objet l'utilisation de cellules endothéliales cérébrales immortalisées éventuellement transfectées avec un gène codant pour une substance active pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention par thérapie génique d'une maladie du système nerveux central chez un sujet par administration par voie intra-artérielle (intra-carotidienne) audit sujet d'une quantité suffisante desdites cellules pour délivrer au niveau du système nerveux central ladite substance active.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant la préparation des cellules endothéliales cérébrales immortalisées transfectées avec un gène codant pour une substance active et leur utilisation dans le traitement par thérapie génique d'une maladie du système nerveux central chez un patient par administration par voie intra-artérielle. Ces exemples se réfèrent aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 montre les lésions parenchymateuses induites par les injections de cellules endothéliales.

- La figure 2 montre l'identification des cellules RBE4 pré-marquées dans le cerveau.

- La figure 3 montre l'identification des cellules RBEZ dans le cerveau après révélation de la bêtagalactosidase nucléaire par le X-Gal.

I - Matériel et méthodes.

Les trois lignées cellulaires suivantes ont été utilisées : la lignée parentale RBE4 et deux lignées
5 dérivées de RBE4, la lignée RBEZ et la lignée RBE4/GFP. Les lignées RBE4 et RBEZ sont décrites dans la demande de brevet internationale PCT No. WO96/11278.

La lignée RBE4 a été obtenue par la transfection de cellules endothéliales cérébrales de rat
10 Lewis en culture primaire par un plasmide immortalisant contenant la séquence E1A de l'adénovirus de type 2. Les conditions de culture pour les cellules RBE4 et les cellules dérivées de RBE4 ont déjà été décrites précédemment (Durieu-Trautmann et al., Frontiers in CVB,
15 1993,331:205-210).

Les cellules RBEZ ont été obtenues par exposition des cellules RBE4 à un vecteur rétroviral non répliquatif MFG-NB contenant le gène LacZ codant pour la
20 bêta-galactosidase de E. Coli associée à une séquence de localisation nucléaire (nls) (Lal et al., PNAS, 1994, 91:9695-9699). Les cellules RBEZ furent ensuite sélectionnées par FACS (fluorescence-activated cell sorting) en utilisant le substrat fluorescent de la bêta-galactosidase, la fluoresceine di-bêta-galactopyranoside (Lal et al., PNAS, 1994, 91:9695-
25 9699).

La lignée RBE4/GFP exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) a été obtenue après transfection des cellules RBE4 avec une construction contenant la
30 séquence GFP sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine dans des cellules RBE4.

II - Préparation et marquage des cellules.

Les cellules en culture ont été dissociées par la trypsine, rincées à plusieurs reprises et mise en suspension en solution à la concentration initiale de 300 000 cellules par microlitre. La solution de dilution
5 utilisée a été soit le PBS glucose (10mMol) comprenant du calcium et du magnésium, soit le PBS glucose sans calcium ni magnésium. Pour l'injection, différentes concentrations de cellules ont été utilisées. Ces concentrations finales de cellules allaient de 10 000
10 cellules à 300 000 cellules par microlitre. Le volume total injecté a été de 500 à 1000 microlitre.

Les cellules RBE4 en culture ont été prémarquées au bisbenzimidazole (Hoechst 33342 Sigma) à la concentration de 7,5 mg/ml pendant 15 minutes à 37°C. Ce colorant nucléaire fluoresce en bleu sous lumière
15 ultraviolette du microscope à fluorescence.

III - Filtration cellulaire.

20 Dans certains cas, la solution finale a été filtrée à l'aide de filtres de blutage (Polylabo, toile à bluter nylon #87404 NY 30 HC) de 30 microns selon le protocole suivant : les cellules à la concentration
25 initiale ont été aspirées à l'aide d'un cône jaune d'une pipette P200 pour être diluées dans la solution de dilution. Les cellules sont alors diluées et dissociées avec douceur par pipetage multiple de la préparation à l'aide d'une pipette P1000 et de son cône bleu
30 correspondant. La suspension cellulaire est ensuite aspiré dans une seringue de 1 ml avec une aiguille rose de 18 gauge. Le filtre de 30 microns a été trempé au préalable dans du sérum physiologique stérile puis désinfecté dans l'alcool à 100°, séché à l'air, retrempé dans du sérum physiologique stérile. Le filtre est
35 ensuite placé entre l'aiguille et l'embout de la

seringue contenant les cellules. Le piston est poussé délicatement de manière à avoir un écoulement goutte à goutte des cellules diluées. En cas de difficultés à pousser le piston, le filtre est remplacé. Cette manœuvre de remplacement peut se faire jusqu'à 2 fois pour un ml. La viabilité des cellules a été mesurée avant et après filtration après coloration au Bleu trypan et lecture sur cellule de Malassez.

10 IV - Les injections intra-carotidiennes.

Des rats adultes mâles Lewis (Iffa-Credo) pesant 300 g en moyenne, ont été anesthésiés par anesthésique volatil (Isoflurane) dans un mélange oxygène et protoxyde d'azote. Une induction de 5 minutes par l'isoflurane à 5% a été suivi d'une dose de maintien de 1% pour l'opération qui durait généralement 30 à 40 minutes. L'incision des tissus cutanés et sous cutanés a été réalisé à l'aide d'un bistouri monopolaire. Les tissus musculaires ont ensuite été écartés pour permettre une exposition correcte, à gauche, de la carotide commune, la bifurcation carotidienne, la carotide externe et interne. Après dissection précautionneuse de la bifurcation carotidienne, une cautérisation des branches collatérales de l'artère carotide externe a été effectuée à l'aide d'un thermo-coagulateur bipolaire. Une thermocoagulation a aussi été effectué sur l'extrémité céphalique de l'artère carotide externe afin d'avoir un moignon cathétérisable le plus long possible. Un clip vasculaire (type SUNDT pour malformation artério-veineuse), préalablement trempé dans l'héparine diluée, est ensuite posé sur la carotide externe, proche de la bifurcation carotidienne. Une cathétérisation du moignon exclu de la circulation artérielle est réalisée à l'aide d'un cathéter à ailette

en Vialon (0,7x19 mm, Insyte-W_{TM}, Becton Dickinson) préalablement rincé par de l'héparine diluée. Une pointe de colle par de la Super-glue (Loctite) sur la collerette artérielle autour du cathéter est ensuite posée afin de solidariser le moignon et le cathéter. Le clip est ouvert pour permettre un reflux de sang artériel dans le cathéter et l'évacuation d'un éventuel caillot qui aurait pu se former. Le flux est à nouveau interrompu pour permettre l'adaptation de la seringue, contenant les cellules, à l'embout du cathéter. Le flux est ensuite rétabli et l'injection est effectuée manuellement ou à l'aide d'un pousse seringue motorisé dont la vitesse aura été préalablement réglée pour permettre une équilibration des flux entre le sang arrivant de la carotide commune et la solution venant du cathéter. L'injection se fait sous le contrôle de la loupe chirurgicale (Leica). A la fin de l'injection le moignon est cautérisé tout en vérifiant que le flux dans la carotide commune et interne soit parfaitement maintenu. Les animaux contrôles ont subi la même opération que celle décrite ci-dessus mais seul le tampon de dilution de la suspension cellulaire a été injecté, sans les cellules endothéliales.

25 V - Etude par imagerie des tissus.

Certains rats ont subi une IRM cérébrale sur un appareil de 7 Tesla (appareil Varian) voire une spectroscopie. L'imagerie IRM a été réalisée avec des coupes coronales jointives de 1 mm de tout le cerveau et des coupes coronales jointives centrées sur le cerveau antérieur (télencephale et diencéphale, à l'exclusion du bulbe olfactif) de 500 microns. Des séquences pondérées en T2 ont été utilisées dans la majorité des cas. Dans les rares cas où les IRM étaient réalisées avant 24

heures une séquence de diffusion était rajoutée pour identifier les lésions éventuellement non visibles en séquences T2. Lorsque le cerveau ne montrait pas d'anomalies parenchymateuses à l'IRM, une spectroscopie
5 était réalisée afin de comparer les profils spectraux droits et gauche chez un même animal.

VI - Etude histologique.

10 Les animaux ont été sacrifiés à différents temps après injection. En cas de sacrifice immédiat, les différents organes prélevés (cerveau, cœur, foie, rein, œil, rate, testicule, carotide gauche) ont été
15 immédiatement congelés dans l'isopentane refroidie par l'azote liquide. En cas de sacrifices plus tardifs, les animaux ont eu une perfusion transcardiaque de 100 ml de PBS puis de 500 ml de PFA 4%. Les cerveaux prélevés ont été, post-fixés pendant 2 à 4 heures dans le PFA 4% puis
20 cryoprotégés dans du sucrose (20 à 30%) pendant 48 heures. Les cerveaux ont ensuite été congelés dans l'isopentane. Tous les tissus ont été sectionnés au cryostat soit pour obtenir des coupes montées sur lame de 30 microns d'épaisseur (tous les organes) ou des
25 coupes flottantes (le cerveau) de 40 microns d'épaisseur. Les coupes flottantes étaient ensuite incubées dans une solution comprenant du X-gal pendant 3 heures 30 en cas d'utilisation de cellules RBEZ selon la technique décrite par Weis et al. (1991). Les tissus
30 contrôles étaient toujours traités de manière concomitante

VII - Résultats.

35 Quarante huit rats ont été opérés et injectés. Neuf ont eu une injection manuelle et 39 une

injection à l'aide d'un moteur électrique portable de
notre conception afin d'obtenir une injection lente et
régulière. Les premières opérations ont permis de
confirmer l'absence de thrombose après injection de la
5 carotide commune et interne.

1) Mortalité.

Sept rats sont morts prématurément dont 5
quelques minutes après l'injection avec semble t-il des
10 problèmes respiratoires (n=3), des troubles
neurologiques avec convulsions (n=1) ou sans cause
évidente (n=1). Dans tous les cas ces morts sont
survenus avant l'utilisation des filtres. Pour 6/7 rats
la dose injectée était \geq 50 millions de cellules. Aucun
15 décès n'a été identifié dans le groupe contrôle (n=10).

2) Effets délétères tissulaires.

a) IRM et spectroscopie.

20 Afin d'étudier les lésions tissulaires
produites par les injections intra-carotidiennes de
cellules endothéliales génétiquement modifiées nous
avons réalisé des IRM cérébrales et des études en
spectroscopie. L'IRM cérébrale représentée aux figures 1
25 et 2 en annexe fournit des données morphologiques alors
que la spectroscopie fournit des données chimiques. La
spectroscopie a surtout été réalisée lorsque l'IRM était
normale. Vingt IRM (rats #17, 18, 20, 22, 23, 24, 25,
26, 27, 29, 30 (2 fois), 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39)
30 ont été réalisées et 6 spectroscopies. Elle était
toujours normale chez les animaux contrôles (n=3)

On observe sur les photos de la figure 1,
les coupes coronales IRM jointives de 1 mm, séquences
pondérées en T2. A, B, C : injection de 25 millions de
35 cellules RBEZ non filtrées ; D, E, F : injection de 25

millions de cellules RBEZ après filtration. Il convient de remarquer en A, B, C la présence d'un hypersignal cortical et putaminal gauche ipsilatéral à l'injection qui est le témoin d'un infarctus cérébral; les
5 ventricules latéraux (hypersignaux plus intenses et homogènes que la lésion) droit et gauche sont dilatés ; la lésion provoque aussi un effet de masse avec déplacement de la ligne médiane. En D, E, F, on note l'absence d'hypersignal parenchymateux, de dilatation
10 ventriculaire et d'effet de masse.

On observe sur les photos de la figure 2, les coupes coronales histologiques de cerveau permettant identification de cellules RBE4 préalablement marquées au bisbenzimidazole et visualisées en épifluorescence par
15 une émission dans les ultra-violets. En A-D, observation du parenchyme cérébral quelques minutes après injection intracarotidienne. En F,G, observation 7 jours après. Les flèches en B et C identifient des cellules marquées dans les micro-vaisseaux intracérébraux. Il convient de
20 remarquer en E, la présence de cellules marquées dans les vaisseaux du plexus choroïde. La flèche en F montre un vaisseau exprimant une cellule positive. En G, la flèche montre la présence de cellules marquées dans les plexus choroïdes.

25 Pour deux rats, L'IRM a été réalisée 15 heures environ après l'injection des cellules, et dans ces cas des séquences de diffusion ont été réalisées en plus des séquences T2 pour être certain de bien
30 visualiser les modifications parenchymateuses. Dans les autres cas, les IRM ont été faites entre 4 et 7 jours post-injection. Avant le protocole de filtration, 13 IRM ont été réalisées et 7 IRM après. Avant filtration, pour les rats injectés avec 10 millions (n=3) aucune lésion
35 parenchymateuse n'a été détectée sur IRM ou

spectroscopie; néanmoins une dilatation ventriculaire était visible dans 2 des 3 cas toujours du côté gauche correspondant à la carotide injectée. Parmi les rats injectés avec 25 millions (n=4) une dilatation ventriculaire était visible dans 3 cas mais sans anomalie parenchymateuse et un rat présentait un hypersignal parenchymateux. Dans les 3 cas sans anomalie à l'IRM, 2 sur 3 avaient une spectroscopie anormale. Parmi les rats injectés avec 50 millions (n=2) les 2 avaient des lésions d'hypersignal parenchymateuses visibles en IRM.

Après application du protocole de filtration, les cerveaux des rats injectés avec 25 millions (n=2) ne présentaient pas d'hypersignal parenchymateux, mais l'un d'eux avait une dilatation ventriculaire. Parmi les cerveaux de rats injectés avec 50 millions (n=4) un seul révélait un hypersignal cortical gauche. Ce rat avait néanmoins été préalablement traité par mannitol afin d'ouvrir la barrière hémato-encéphalique. Un autre, parmi les 3 restants, avait une dilatation du ventricule latéral ipsilatérale à l'injection.

b) Histologie des tissus injectés.

Les colorations des coupes par un colorant de Nissl (cresyl violet) n'ont pas révélé de lésions paranchymateuses évidentes après injection de cellules filtrées. Par contre, avant filtration, l'injection de cellules provoquait des anomalies histologiques. Ces anomalies étaient d'une part, des pertes cellulaires avec perte régionale de la lamination des différentes couches du cerveau et d'autre part, une hypercellularité, témoin d'une réaction inflammatoire microgliale et astrocytaire.

35

3) Localisations des cellules.

a) Identification des cellules RBE4 prémarquées au Bisbenzimidé.

5 Quelques minutes après injection de cellules endothéliales RBE4 marquées par le Bisbenzimidé, les cellules étaient clairement identifiées dans les micro-vaisseaux du cerveau, comme montré sur la figure 3. Sept jours après l'injection, quelques cellules sont encore
10 visibles, intégrées dans des vaisseaux sanguins mais aussi au sein du parenchyme.

 La figure 3 montre en A, une cellule RBEZ est incorporée à la lumière d'un vaisseau intracérébral. En B, une cellule RBEZ en position
15 extraluminale intra-parenchymateuse. Il convient de remarquer en C (agrandissement de B) la bordure du vaisseau (flèches noires).

b) Identification des cellules RBEZ par la coloration au X-Gal.

20 Des greffes systémiques de cellules RBEZ permettent de mettre en évidence, 7 jours post-injection, des cellules dont le noyau est bleu, soit intégrées dans des vaisseaux, soit dans le parenchyme à
25 distance de la paroi vasculaire. La localisation nucléaire du marquage X-gal a été confirmée par un marquage des coupes à l'aide du bisbenzimidé (Hoechst), un colorant du noyau. Lorsque le marquage était
30 effectivement nucléaire le marquage fluorescent Hoechst était masqué par la coloration au X-gal. En revanche lorsque le marquage était cytoplasmique le marquage nucléaire était clairement visible témoignant d'une
 expression de la bêta-galactosidase endogène (non montré) caractéristiques des cellules macrophagiques.

35

c) Identification des cellules GFP par épifluorescence.

5 Des cellules exprimant le GFP étaient
visibles sous forme d'une coloration fluorescente verte
à 1, 3 et 5 jours après injection de cellules
endothéliales GFP. Le marquage vert de la GFP était
visible à la fois dans le cytoplasme et le noyau de la
cellule comme a permis de le confirmer les contre-
colorations du noyau à l'aide du Bisbenzimidide. Deux
10 types de morphologie de cellules endothéliales étaient
visibles. D'une part, des cellules rondes isolées qui
semblaient en position endovasculaires et d'autre part,
des cellules allongées souvent par groupe de 2 au sein
du parenchyme.

15

REVENDICATIONS

- 5 1) Préparation de cellules de mammifère éventuellement transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents.
- 10 2) Préparation de cellules de mammifère selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns.
- 15 3) Préparation de cellules de mammifère selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que lesdites cellules sont immortalisées.
- 20 4) Préparation de cellules de mammifère selon l'une quelconque des revendication 1 à 3, caractérisée en ce que les cellules sont non tumorigènes.
- 25 5) Préparation de cellules de mammifère selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdites cellules sont choisies dans le groupe comprenant les cellules endothéliales et les cellules épithéliales de mammifères.
- 30 6) Préparation de cellules de mammifère selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce

que lesdites cellules sont choisies dans le groupe comprenant les cellules cérébrales et rétiniennes.

5 7) Préparation de cellules de mammifère selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que lesdites cellules ont subies un traitement biologique, chimique ou physique empêchant la formation d'agrégat ou supprimant spécifiquement les agrégats desdites cellules d'une taille supérieure à 10 environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns, puis mises en suspension dans un milieu permettant la survie desdites cellules et ne favorisant pas leur ré-agrégation.

15 8) Préparation de cellules de mammifère selon la revendication 7, caractérisée en ce que le traitement biologique consiste à modifier génétiquement les dites cellules par une séquence d'acide nucléique exprimant un agent empêchant la formation d'agrégat ou 20 inhibant l'expression d'un agent favorisant la formation d'agrégat desdites cellules.

25 9) Préparation de cellules de mammifère selon la revendication 7, caractérisée en ce que le traitement physique consiste en une filtration ou un tamisage.

30 10) Composition pharmaceutique pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation de cellules selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, en association dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable permettant la

survie desdites cellules et ne favorisant pas leur ré-agrégation.

5 11) Composition pour être administrée par
voie intra-artérielle, avantageusement intra-
carotidienne, chez un patient, selon la revendication
10, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation
de cellules ne comprenant pas d'agrégat desdites
10 cellules d'une taille supérieure à 50 microns et de
préférence supérieure à 30 microns.

15 12) Composition pour être administrée par
voie intra-veineuse, chez un sujet, selon la
revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend
une préparation de cellules ne comprenant pas d'agrégat
desdites cellules d'une taille supérieure à 200 microns
et de préférence supérieure à 100 microns.

20 13) Composition selon l'une quelconque des
revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle
comprend de l'ordre de 1 000 à 300 000 cellules par
microlitre de composition.

25 14) Composition pharmaceutique pour être
administrée par voie systémique dans un procédé de
thérapie génique d'une maladie du système nerveux
central chez un sujet, selon l'une des revendications 10
à 13, caractérisée en ce que les cellules sont
transfectées avec au moins un gène codant pour une
30 substance active dans le traitement ou la prévention
d'une maladie du système nerveux.

35 15) Composition selon la revendication 14,
caractérisée en ce que la substance ou le gène actif
dans le traitement ou la prévention d'une maladie du

5 système nerveux est choisie parmi les facteurs de croissance, les facteurs anti-apoptotiques, les gènes tueurs, les antiprotéases, les immunomodulateurs, les gènes suppresseurs de tumeur, les gènes bloquant le cycle cellulaire.

10 16) Composition selon l'une des revendications 14 à 15, caractérisée en ce qu'elle est dosée de façon à permettre une administration de 1 million à 200 millions de cellules de mammifère immortalisées transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active par kilogramme de poids du sujet à traiter.

Fig.1

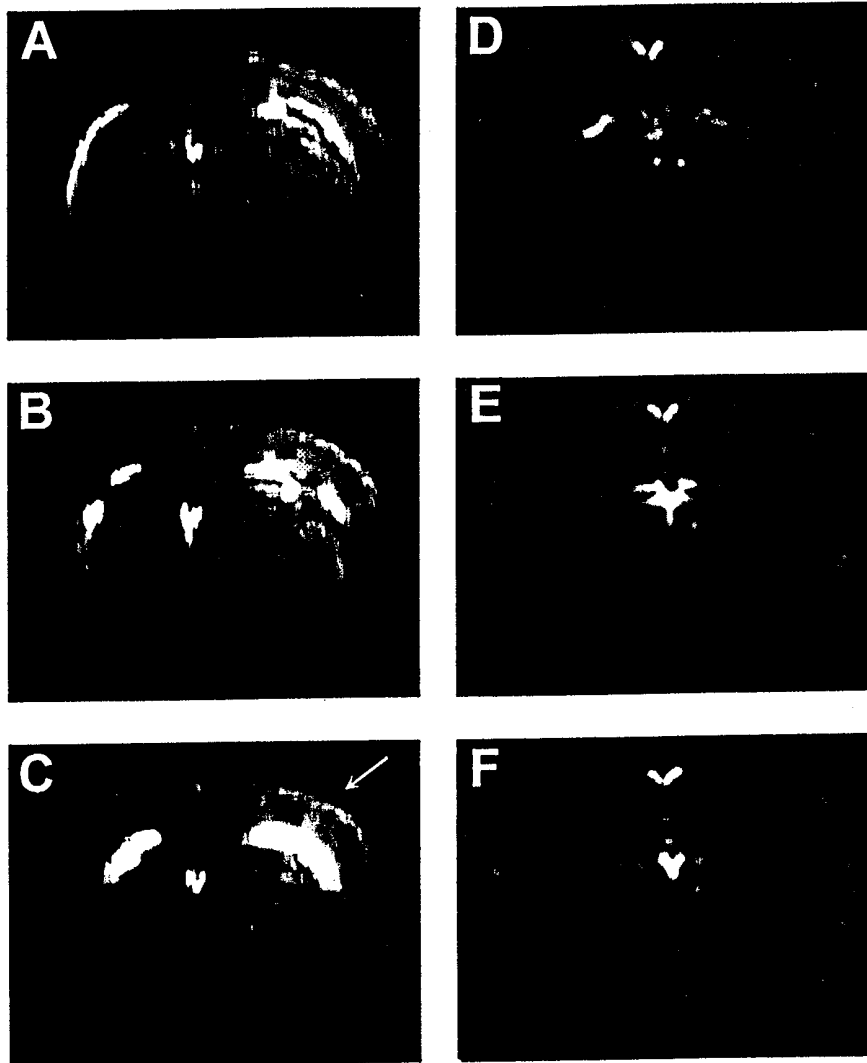


Fig.2

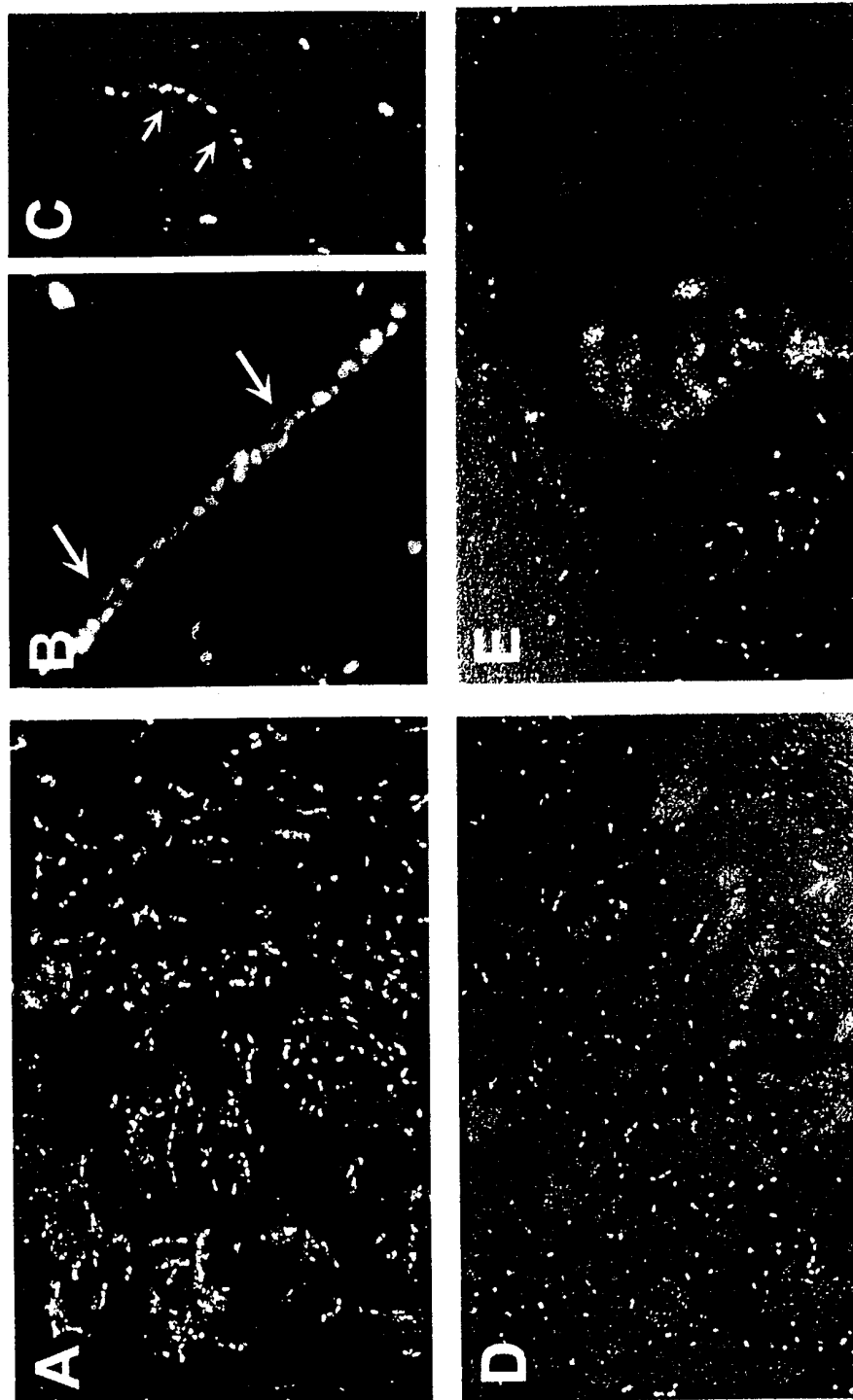
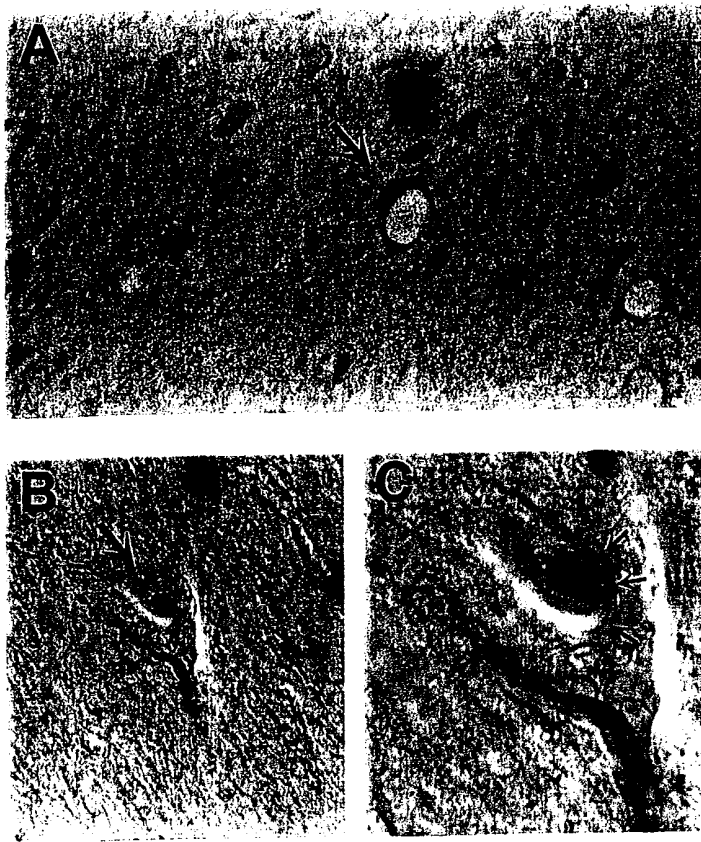


Fig.2 suite



Fig.3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 99/02964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K48/00 C12N5/10 A61P25/00

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 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.
A	WO 97 40139 A (NEUROTECH SA ; ADAMSON PETER (GB); GREENWOOD JOHN (GB); LUND RAYMON) 30 October 1997 (1997-10-30) cited in the application	
A	WO 96 11278 A (CHAUVEROT NATHALIE ; TCHELINGERIAN JEAN LEON (FR); ADIM (FR); ROUX F) 18 April 1996 (1996-04-18) cited in the application	

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

3 March 2000

Date of mailing of the international search report

13/03/2000

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. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02964

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740139 A	30-10-1997	FR 2747690 A	24-10-1997
		AU 2704197 A	12-11-1997
		CA 2225520 A	30-10-1997
		EP 0833895 A	08-04-1998
		JP 11508142 T	21-07-1999
		NZ 329360 A	28-05-1999
		-----	-----
WO 9611278 A	18-04-1996	FR 2726005 A	26-04-1996
		AU 3657595 A	02-05-1996
		CA 2202066 A	18-04-1996
		EP 0787197 A	06-08-1997
		JP 10507074 T	14-07-1998
		NZ 293994 A	25-02-1999
		-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No
PCT/FR 99/02964

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K48/00 C12N5/10 A61P25/00

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 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)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 40139 A (NEUROTECH SA ; ADAMSON PETER (GB); GREENWOOD JOHN (GB); LUND RAYMON) 30 octobre 1997 (1997-10-30) cité dans la demande	
A	WO 96 11278 A (CHAVEROT NATHALIE ; TCHELINGERIAN JEAN LEON (FR); ADIM (FR); ROUX F) 18 avril 1996 (1996-04-18) cité dans la demande	

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 antérieur 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

3 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/03/2000

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

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No
PCT/FR 99/02964

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9740139 A	30-10-1997	FR 2747690 A	24-10-1997
		AU 2704197 A	12-11-1997
		CA 2225520 A	30-10-1997
		EP 0833895 A	08-04-1998
		JP 11508142 T	21-07-1999
		NZ 329360 A	28-05-1999
WO 9611278 A	18-04-1996	FR 2726005 A	26-04-1996
		AU 3657595 A	02-05-1996
		CA 2202066 A	18-04-1996
		EP 0787197 A	06-08-1997
		JP 10507074 T	14-07-1998
		NZ 293994 A	25-02-1999