

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 890 977

②① N° d'enregistrement national : **05 09557**

⑤① Int Cl⁸ : C 12 N 5/08 (2006.01), A 61 K 9/10, A 61 P 9/10, 35/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 19.09.05.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 23.03.07 Bulletin 07/12.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS Etablissement public — FR et INSTITUT DES VAISSEAUX ET DU SANG — FR.

⑦② Inventeur(s) : LE RICOUSSE SOPHIE, LACASSAGNE MARIE NOELLE et MAROLLEAU JEAN PIERRE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ PROCÉDE D'OBTENTION DE CELLULES MUSCULAIRES LISSES HUMAINES ET LEURS APPLICATIONS.

⑤⑦ La présente invention est relative à un procédé d'obtention in vitro d'une population de cellules comprenant essentiellement des cellules musculaires lisses humaines (hCML) exprimant la calponine et la SM-MHC à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées in vitro en cellules musculaires squelettiques (hCMS). L'invention comprend également une composition comprenant les cellules musculaires lisses isolées susceptibles d'être obtenues par un tel procédé à titre de composition thérapeutique destinée à l'Homme. L'invention a également pour objet l'utilisation de ces cellules musculaires lisses isolées pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée au remplacement de CMLs. En particulier, l'invention a pour objet l'utilisation de ces cellules musculaires lisses isolées pour le traitement de l'ischémie, du cancer ou de toute maladie nécessitant la revascularisation de tissus endommagés. Enfin, la présente invention a pour objet l'utilisation de ces cellules musculaires lisses isolées comme vecteur de principe actif pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à l'homme nécessitant un traitement par ce principe actif.

FR 2 890 977 - A1



La présente invention est relative à un procédé d'obtention *in vitro* d'une population de cellules comprenant essentiellement des cellules musculaires lisses humaines (hCML) exprimant la calponine et la SM-MHC à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS). L'invention comprend également une composition comprenant les cellules musculaires lisses isolées susceptibles d'être obtenues par un tel procédé à titre de composition thérapeutique destinée à l'Homme. L'invention a également pour objet l'utilisation de ces cellules musculaires lisses isolées pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée au remplacement de CML. En particulier, l'invention a pour objet l'utilisation de ces cellules musculaires lisses isolées pour le traitement de l'ischémie, du cancer ou de toute maladie nécessitant la revascularisation de tissus endommagés. Enfin, la présente invention a pour objet l'utilisation de ces cellules musculaires lisses isolées comme vecteur de principe actif pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à l'homme nécessitant un traitement par ce principe actif.

Les cellules musculaires lisses (CML), présentes dans les vaisseaux, les intestins et la vessie, et les cellules musculaires squelettiques (CMS) sont les deux types cellulaires utilisés par l'organisme pour remplir la fonction de contraction mécanique. L'origine des CML est complexe et dépend de leur localisation. En effet au cours de l'embryogenèse, les précurseurs des CML peuvent provenir de trois lignages : les cellules mésenchymateuses, les cellules de la crête neurale ou les cellules dérivant de l'épicaarde. Récemment, l'existence de progéniteurs de CML circulant dans le sang périphérique a été observée. En effet, différents modèles animaux utilisés pour étudier (i) la formation néointimale des vaisseaux, (ii) le devenir des greffes artérielles ou la formation des plaques d'athérosclérose, ont permis de mettre en évidence la participation des progéniteurs contenus dans les cellules de la moelle à ces processus et leur différenciation en CML.

Chez l'adulte, la réparation des fibres musculaires squelettiques est assurée par la population des cellules satellites, cellules myogéniques mononucléées situées sous la lame basale des fibres musculaires. Mais il semble que cette population cellulaire soit hétérogène. De plus d'autres cellules, multipotentes, isolées du muscle squelettique par cytométrie en flux selon leur propriété à libérer le colorant Hoechst (1, 2), sont capables

de se différencier en toutes les cellules du sang quand elles sont transplantées chez des souris dont la moelle osseuse a été détruite par irradiation (2). Cette population cellulaire a été appelée « side population » (SP). Elle est définie par l'expression du marqueur Sca1. En revanche elle n'exprime pas le CD34, le ckit et le CD45. Ces cellules sont capables de se différencier en cellules de muscle desmine⁺ dans des conditions de cultures appropriées (1). D'autres travaux décrivent l'existence de cellules précurseurs dans le muscle squelettique ayant des propriétés de « plasticité » cellulaire importantes (3). Le muscle squelettique semble donc contenir plusieurs types de cellules souches ayant des propriétés de multipotences variées.

10 La définition des propriétés de différenciation de ces cellules souches et leur contrôle en culture permettraient d'utiliser ces cellules, facilement isolables, en thérapie notamment en thérapie réparatrice. Ces cellules, cultivées ex vivo, pourront alors être transplantées constituant un produit de thérapie cellulaire pour le traitement en autologue des pathologies vasculaires (revascularisation post-ischémique, athérosclérose, stabilisation des vaisseaux tumoraux, ...).

15 La différenciation des CMS a déjà été décrite chez le rat par Hwang JH. et al. (4) en utilisant un procédé mettant en œuvre une coculture de CMS avec des CML de vessie et en présence de VEGF, ce procédé permettant d'obtenir des CMS différenciées exprimant l' α SMA.

20 On peut également citer la demande de brevet internationale publiée sous le No. WO 03/027281 (Sakurada Kazuhiro et al.) décrivant l'obtention d'une population de cellules souches multipotentes provenant du tissu intersticiel du muscle squelettique capable de se différencier en neurones, cellules gliales, cellules du muscle cardiaque, adipocytes, cellules de l'endothélium vasculaire, cellules du sang, cellules osseuses, cellules du cartilage, cellules du pancréas et cellules hépatiques.

25 On peut enfin citer la demande de brevet internationale publiée sous le No. WO 01/94555 (J.P. Marolleau et al.) décrivant un procédé d'obtention de populations cellulaires caractérisées d'origine musculaire et leurs utilisations. Ce document décrit en particulier un procédé d'obtention d'une population de cellules dont le type cellulaire dominant exprime le marqueur CD56 et le marqueur HLA de classe I, à partir d'une biopsie de tissu musculaire, pour la préparation d'un produit de thérapie cellulaire apte à

l'administration humaine, notamment de transplant pour potentialiser les traitements pharmacologiques des insuffisances cardiaques.

Il serait donc souhaitable de pouvoir disposer d'un procédé d'obtention *in vitro* d'une population de cellules comprenant essentiellement des cellules musculaires lisses (CML), notamment à partir d'un échantillon de tissu musculaire issu d'individu ou de patient que l'on souhaite traiter à l'aide de cette population.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Ainsi, sous un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé d'obtention *in vitro* d'une population de cellules comprenant essentiellement des cellules musculaires lisses humaines (hCML) exprimant la calponine et la chaîne lourde de la myosine musculaire lisse, dénommée ici SM-MHC (« SM-MHC » pour « Smooth Muscle Myosin Heavy Chains »), à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS),

- lesdites cellules de biopsies musculaires humaines n'exprimant pas le CD31 et le CD14, et, le cas échéant, les marqueurs des lymphocytes B et T, et
- lesdites hCMS exprimant le CD56, la desmine et un gène de la myogénèse choisi dans le groupe de gènes constitué du gène MyoD, Myf5 et la myogénine, et sont capables de générer des myotubes multinucléés,

caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

A) la mise en culture desdites cellules de biopsies musculaires humaines myoblastiques dans un milieu de culture comprenant du VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), de préférence du VEGF de séquence humaine, ladite culture étant de préférence réalisée en absence de CML issues de vessie ; et

B) la récupération des hCML obtenues à l'étape A).

Par le terme « essentiellement » dans l'expression « comprenant essentiellement des cellules musculaires lisses humaines (hCML) », on entend désigner ici notamment une population contenant au moins 50 %, de préférence à au moins 60 %, 70 %, 75 % et 80 % de hCML par rapport à la population cellulaire globale obtenue.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites hCMS exprimant le CD56 et la desmine, expriment les gènes MyoD, Myf5 et la myogénine.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites hCMS n'expriment pas le CD34 et le CD14.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites hCMS n'expriment pas la calponine et la SM-MHC.

5 De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites hCML obtenues à l'étape A) expriment la calponine et la SM-MHC.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites hCML obtenues à l'étape A) n'expriment pas le gène MyoD.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites
10 hCML obtenues à l'étape A) à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques humaines (hCMS), expriment le CD56 et la desmine en quantité significativement moins importante que lesdites cellules hCMS utilisées à l'étape A).

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites
15 hCML obtenues à l'étape A) expriment Myf5 et la myogénine.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ledit milieu de culture utilisé à l'étape A) comprend en outre au moins un facteur de croissance, de préférence de séquence humaine, choisi dans le groupe de facteurs de croissance constitué du PDGF-BB (facteur de croissance dérivé des plaquette, homodimère BB,
20 dénommé encore homodimère bb), IGF1 (facteur de croissance apparenté à l'insuline de type 1), FGFb (facteur de croissance fibroblastique basique), HGF (facteur de croissance des hépatocytes) et TNF α (facteur nécrosant les tumeurs de type alpha), TGF β et tous autres facteurs pouvant avoir un rôle sur la prolifération ou la différenciation des CML.

De préférence, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites
25 hCML sont obtenues à l'étape A) à partir d'un échantillon de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS), caractérisé en ce que lesdites hCMS sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) éminçage de ladite biopsie musculaire,
- 30 b) dissociation enzymatique des fibres et cellules musculaires et séparation des cellules individualisées par filtration,

- c) mise en culture des cellules d'origine musculaire ainsi obtenues dans un réacteur de culture de cellules adhérentes en présence d'un milieu de croissance et/ou de différenciation suivie le cas échéant d'une ou plusieurs phases d'expansion,
- d) identification des types cellulaires présents aux différents stades de la culture par l'analyse de marqueurs cellulaires spécifiques,
- e) choix du stade de culture pendant lequel le type cellulaire recherché est en proportion dominante dans la population de cellules,
- f) récolte d'une population de cellules au stade de culture choisi en e),
- g) le cas échéant, congélation des cellules prélevées à l'étape f), notamment au stade de culture qui sera choisi pour la préparation du produit de thérapie cellulaire.

Selon un mode préféré du procédé ci-avant selon l'invention, on effectue :

- à l'étape b) :

- un lavage des éminçats dans un milieu A suivi de la dissociation enzymatique en présence de libérase dudit éminçat ;

- la séparation des cellules individualisées ainsi obtenues par filtration sur tamis suivie d'une centrifugation ; et

- le lavage dans un milieu B du culot cellulaire ainsi obtenu,

- à l'étape c) :

- la mise en culture des cellules obtenues à l'étape b) sur un plateau de culture dans un milieu C jusqu'à obtenir un degré de confluence d'environ 20 à 50 % ou jusqu'à l'apparition des premiers myotubes, puis le lavage des cellules en tampon PBS (tampon phosphate salin), en SVF (sérum de veau foetal) puis en milieu C, la culture en milieu C sur des unités de plateaux élargis ou multi-étagés pouvant être de nouveau réalisée pour atteindre un degré de confluence d'environ 90 % ou l'apparition des premiers myotubes ;

- l'élimination du milieu de culture C et son remplacement par un milieu D la veille de la récolte desdites cellules ; et

- le lavage des cellules ainsi obtenues en PBS puis en milieu A,

- le cas échéant, à la fin de l'étape f) :

- la concentration desdites cellules ainsi obtenues en milieu A supplémentée de sérum albumine humaine à 0,5 % (P/V), et

- à l'étape g) :

- la congélation desdites cellules ainsi obtenues à l'étape f) est réalisée en milieu A supplémenté de sérum albumine humaine à 4 % (P/V) et en DMSO à 7,5 % (V/V), leur décongélation à 37°C, puis après un lavage en milieu A, leur suspension dans le milieu de culture,

- 5 et dans lesquelles étapes lesdits milieux A, B, C et D sont les milieux tels que définis dans la demande internationale de brevet publiée sous le No. WO 01/94555 le 13 décembre 2001 (pages 24 et 25) à savoir :

Milieu A :

- 10 - Milieu MCDB 120 (Ham et al., 1988) modifié : substitution de la L-valine par de la D-valine, élimination du rouge de phénol et de la thymidine.

Milieu B :

- Milieu A + 20 % de sérum de veau fœtal irradié + antibiotique.

Milieu C :

- Milieu B + FGFb (10 ng/ml) + dexaméthasone à 1 µM.

- 15 Solution D : Tampon phosphate salin (PBS).

De préférence, l'antibiotique utilisé est de la gentamycine, notamment à 50 µg par ml, ou un mélange de pénicilline et de streptomycine (notamment à 100 UI/ml et 100 µg/ml respectivement).

- 20 Dans un mode de réalisation encore préféré, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites hCML sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine préalablement prédifférenciées en hCMS obtenues selon le procédé tel que décrit dans la demande internationale de brevet publiée sous le No. WO 01/94555, et dans lequel procédé, le stade de culture pendant lequel le type cellulaire hCMS recherché est en proportion significative dans la population de cellules,
- 25 est déterminé par l'apparition d'une population cellulaire de phénotype CD56+ représentant au moins 50 %, de préférence à au moins 60 %, 70 %, 75 % et 80 % de la population générale.

- De préférence, ladite population cellulaire de phénotype CD56+ représentant au moins 50 %, de préférence à au moins 60 %, 70 %, 75 % et 80 % de la population
- 30 générale possède en outre l'un au moins des phénotypes, de manière préférée au moins 2, 3 et les 4 phénotypes, choisi dans le groupe de phénotypes constitué de CD10+, CD13+, desmine+, HLA de classe 1 et n'exprimant pas le HLA de classe 2.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé d'obtention *in vitro* d'une population de cellules comprenant essentiellement des hCML selon l'invention et dans lequel procédé lesdites hCML sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS), est caractérisé en ce que à l'étape A), ledit milieu de culture
5 comprenant du VEGF est le milieu MCDB 120 tel que décrit par Ham et al. (*in vitro* Cell Dev. Biol., 24, 833-844, 1998) et modifié par substitution de la L-Valine par la D-Valine, élimination du rouge de phénol et de la thymidine.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé d'obtention *in vitro* d'une
10 population de cellules comprenant essentiellement des hCML selon l'invention et dans lequel procédé lesdites hCML sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsies musculaires humaines, est caractérisé en ce qu'à l'étape A), ledit milieu de culture comprenant du VEGF est le milieu M199 (comme par exemple Medium 199 Gibco, Grand Island, NY).

15 Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé d'obtention *in vitro* d'une population de cellules comprenant essentiellement des hCML selon l'invention est caractérisé en ce qu'à l'étape A), ledit milieu de culture comprend 10 ng/ml de VEGF.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé d'obtention *in vitro*
20 d'une population de cellules comprenant essentiellement des hCML selon l'invention est caractérisé en ce que la biopsie musculaire humaine à partir de laquelle lesdites hCML sont obtenues directement ou préalablement prédifférenciées en hCMS, est une biopsie prélevée dans tout territoire musculaire, de préférence dans le territoire musculaire de la jambe, de l'individu, individu enfant ou adulte, chez qui le prélèvement
25 est effectué.

Sous un autre aspect, la présente invention comprend les cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'invention, lesdites cellules musculaires lisses humaines isolées étant caractérisées en ce qu'elles expriment la calponine et la SM-MHC.

30 Sous encore un autre aspect, la présente invention a pour objet une composition comprenant des cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines

différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, à titre de médicament.

La présente invention comprend également l'utilisation de cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, ou l'utilisation de la composition à titre de médicament selon l'invention pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à l'Homme, notamment destinée à l'individu dont sont originaires les cellules de biopsie musculaire cultivées à l'étape A) dudit procédé.

Dans un mode de réalisation préféré, ladite composition thérapeutique est destinée au remplacement ou à la transplantation de CML chez l'Homme, de préférence le remplacement ou la transplantation est de type autologue.

De préférence, ladite composition thérapeutique est destinée à la prévention ou au traitement de cancers, de préférence en administration préalable ou simultanée à un traitement anti-cancéreux par chimiothérapie ou par radiothérapie.

En effet, contrairement aux vaisseaux normaux, les vaisseaux tumoraux sont structuralement et fonctionnellement différents. L'identification des marqueurs spécifiques des vaisseaux tumoraux permettrait de cibler ces vaisseaux sans détruire la vasculature normale (thérapie anti-angiogénique) (5). De nombreuses études ont démontré les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales (CE) des vaisseaux tumoraux. Et des résultats récents démontrent que les cellules péri-vasculaires (péricytes ou CML) subissent des modifications phénotypiques et fonctionnelles (forme anormale, expression de nouveaux marqueurs, association faible avec les CE, possèdent une extension cytoplasmique qui pénètre profondément dans le parenchyme tumoral) dans le microenvironnement tumoral (6-8), devenant ainsi une nouvelle cible pour les thérapies anti-angiogéniques. Ces caractéristiques physiopathologiques des tumeurs solides compromettent la délivrance et l'efficacité des thérapies cytotoxiques classiques et des thérapies ciblées. Une nouvelle approche thérapeutique serait de rendre normale la vasculature tumorale avant sa destruction pour faciliter la délivrance de drogues (pour revue voir (9)). De fait, des résultats récents démontrent l'efficacité de la régression de la tumeur, à l'aide de thérapies combinées, après stabilisation et normalisation de la

vasculature tumorale (10). Cette stabilisation des vaisseaux tumoraux pourrait être réalisée en injectant les CML au site de la tumeur ou en périphérie.

Cette approche thérapeutique (l'injection des CML humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement obtenues par le procédé selon l'invention, en vue d'une normalisation des vaisseaux tumoraux) ne sera effectuée de préférence qu'en association avec une chimiothérapie ou une radiothérapie. Il faudra pour cela définir une « fenêtre thérapeutique », période au cours de laquelle l'injection des CML permettra l'effet des traitements anti-cancéreux le plus grand.

La « normalisation » vasculaire assurera un réseau plus fonctionnel, favorisant ainsi la diffusion locale des drogues, leur distribution plus homogène et l'oxygénation de la tumeur nécessaire au fonctionnement de certaines drogues. Cela permettra une action plus rapide et plus étendue des drogues dans la tumeur, donc une diminution des doses administrées réduisant à priori la sévérité et la fréquence des effets secondaires. Finalement, la rapidité et la combinaison des actions limiteront rapidement la prolifération et donc les phénomènes de résistance tumorale souvent observés.

La thérapie cellulaire proposée ici, ne constitue pas une nouvelle forme de traitement destinée à remplacer les traitements actuels, mais interviendra comme complément et/ou synergie potentielle aux chimiothérapies et radiothérapies proposées actuellement.

De préférence également, ladite composition thérapeutique est destinée à la prévention ou au traitement de l'ischémie, en particulier cardiaque ou des membres inférieurs.

De nombreuses études réalisées chez la souris et quelques protocoles chez l'humain, ont permis de mettre en évidence l'amélioration de la revascularisation post-ischémique (ischémie cardiaque ou des membres inférieurs) après l'injection de cellules de la moelle ou des cellules différenciées *in vitro*. Si actuellement une réelle intégration de ces cellules aux néovaisseaux semble être remise en cause, les effets fonctionnels observés sont réels. De plus, le rôle des CML dans ces processus pourrait être très important. Des résultats récents démontrent, au site de néovascularisation, la différenciation des cellules de la moelle injectées à des souris, uniquement en cellules périendothéliales, et non pas en cellules endothéliales (11).

Ainsi, de manière plus particulière, la présente invention a pour objet l'utilisation de cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues

ou directement obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, pour la préparation d'une composition destinée à la « normalisation » de la vasculature tumorale ou à la revascularisation post-ischémique.

Cependant ces cellules pourraient être utilisées aussi comme médicament destiné à un usage en thérapeutique pour : l'athérosclérose, les maladies veineuses chroniques, les malformations vasculaires (tels que les angiomes).

C'est pourquoi, la présente invention a également pour objet l'utilisation de cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, pour la préparation d'une composition destinée à la prévention ou au traitement de l'athérosclérose, des arthérites, des maladies veineuses chroniques ou des malformations vasculaires, en particulier des angiomes.

Enfin, de par leurs propriétés de migration vers un site de néoangiogenèse, ces cellules pourront être utilisées comme navette ou vecteur afin de délivrer des principes actifs thérapeutiques comme des drogues ou des facteurs anti ou pro-angiogéniques.

Ainsi, sous un autre aspect particulier, la présente invention a aussi pour objet l'utilisation de cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, à titre de médicament, notamment à titre de vecteur pour l'administration de principe actif ou de composé thérapeutique, caractérisée en ce que :

- lesdites cellules musculaires lisses humaines isolées sont transformées de manière à pouvoir exprimer ledit principe actif ou composé thérapeutique ; ou
- lesdites cellules musculaires lisses humaines isolées ont été modifiées afin de contenir ledit principe actif ou composé thérapeutique que l'on souhaite administrer.

Est également compris dans la présente invention l'utilisation de cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement

obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, lesdites cellules étant capables d'exprimer un principe actif ou composé thérapeutique ou contenant un principe actif ou composé thérapeutique, pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à la prévention ou au traitement de maladies nécessitant un traitement par ledit principe actif ou composé thérapeutique.

De manière préférée, l'utilisation de cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues ou directement obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques par le procédé selon l'invention, pour la préparation d'une composition thérapeutique est caractérisée en ce que ladite composition est administrée par voie intra-veineuse ou par transplantation.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

LEGENDES DES FIGURES

Figures 1A à 1C. Caractérisation des cellules de muscle squelettique cultivées dans un milieu contenant du FGFb. (Figure 1A) L'analyse en cytométrie en flux démontre que ces cellules expriment CD56, la Desmine et CD90 mais qu'elles n'expriment pas CD31, CD14 et CD45. Dans chaque histogramme, la ligne noire correspond aux cellules marquées avec un anticorps de contrôle négatif. La ligne en pointillés correspond aux cellules marquées avec l'anticorps spécifique du marqueur indiqué dans chaque histogramme. Ces histogrammes sont représentatifs de 6 échantillons. (Figure 1B) Analyse par RT-PCR. (Figure 1C) Caractérisation des cellules de muscle squelettique cultivées par analyse immunocytochimique. Les cellules sont marquées soit avec un anticorps anti-IgG de contrôle, un anticorps anti- α SMA ou anti-SM-MHC suivi par un marquage avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

Figures 2A à 2C. (Figure 2A) Morphologie des cellules de muscle squelettique (CMS) dans du milieu contenant du FGFb ou du VEGF. (Figure 2B) Analyse par RT-PCR de

l'expression de gènes spécifiques des cellules de muscle squelettique et lisse dans des CMS cultivées dans un milieu contenant du FGFb ou du VEGF. Les cultures ont été récoltées pour préparer l'ARN aux différents temps indiqués. La RT-PCR a été réalisée et les produits de PCR ont été analysés sur des gels d'agarose contenant du bromure d'éthidium. (Figure 2C) Mise en évidence de l'expression de SM-MHC par immunomarquage dans des CMS cultivées avec du VEGF pendant un mois. Les cellules ont été marquées soit avec un anticorps anti-IgG de contrôle, soit avec un anticorps anti-SM-MHC, suivi par un marquage avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

Figures 3A à 3C. Photos prises au microscope à contraste de phase. Les cellules endothéliales (CE) et les cellules musculaires sont déposées ensemble à la surface d'un gel de collagène. Au bout de 24-48 heures, les CE interagissent avec les CML, issues de la différenciation des précurseurs du sang de cordon ombilical (figure 3A), ou les CML obtenues après culture des cellules de muscle squelettique (figure 3C), pour former des réseaux. En revanche, les CMS ne peuvent pas former des réseaux dans ces conditions (figure 3B).

Figures 4A à 4C. Coupes de matrigel, marquage HES.

La co-injection des CE et des CML obtenues à partir des cellules du muscle squelettique, entraîne la formation, dans l'implant, de lacs vasculaires (figure 4B), avec la présence de globules rouges (ensemble de points au niveau des flèches, figure 4C à plus fort grossissement). En revanche, dans ces mêmes conditions, les CMS ne forment pas un réseau vasculaire fonctionnel (figure 4A).

Figures 5A à 5F. Photos prises au microscope à contraste de phase de CMS (Figures 5A à 5D) et de CML (Figures 5E et 5F) cultivées dans un milieu contenant 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Figures 5A, 5C et 5E) ou 2 % de SVF (Figures 5B, 5D et 5F). Pour induire la formation des cellules en myotubes, le milieu de culture des cellules arrivées à 80-90 % de confluence est changé par un milieu supplémenté à 2 % en SVF. L'abolissement de la formation de myotubes est associé à l'addition de VEGF dans le milieu (Figures 5C à 5F). Les CMS cultivées en présence de VEGF sont incapables de fusionner en myotubes multinucléés (Figure 5D).

Figure 6. Le degré de différenciation des CML est corrélé avec la diminution d'expression de VEGFR2 et l'augmentation de l'expression de FRS (Facteur de Réponse sérique). L'analyse par RT-PCR de 3 échantillons différents de CMS (1, 2 et 3) cultivées en présence de FGFb ou de VEGF. Les cellules progénitrices endothéliales

(CPE), obtenues comme décrit dans (16) sont utilisées à titre de contrôle positif pour l'expression des récepteurs du VEGF (VEGFR) et de contrôle négatif pour FRS. Quelles que soient les conditions de culture, les CMS et les CML n'expriment pas VEGFR1. Dans les CMS, le VEGF diminue l'expression de VEGFR2 mais stimule l'expression de l'ARNm du FRS.

EXEMPLES

METHODES

Culture cellulaire

Les CML différenciées *ex vivo* à partir des précurseurs contenus dans le sang de cordon ont été obtenues comme décrit antérieurement (16). Elles ont été cultivées sur du collagène de queue de rat de type I (60 µg/ml, SIGMA), dans du milieu M199 (Gibco) supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) à 20 %, 25 mM de tampon Hepes (Gibco) et d'une solution antibiotique et antifongique (Gibco) et d'hVEGF recombinant à 10 ng/ml (R & D Systems) à 37°C, et dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine. Les CMS ont été cultivées comme décrit antérieurement (12). Pour induire la différenciation des cellules en myotubes, le milieu de culture des cellules à 80-90 % de confluence a été changé avec du milieu supplémenté à 2 % de SVF, 25 mM d'Hepes et une solution d'antibiotique et d'antifongique (Gibco).

Immunocytochimie

Les cellules ont été mises en culture sur des plaques (« chamber slides », Lab-Tech, Poly Labo, Strasbourg, France) et fixées avec une solution d'acétone à froid à 90 %. Des anticorps primaires ont été utilisés. Un anticorps monoclonal murin anti-αSMA humaine (1A4, DAKO) et un anticorps monoclonal murin anti-chaîne lourde de la myosine de muscle lisse humain (SMMS-1, DAKO). Le kit (DAKO) EnVision™ System Peroxydase (DAB) a été utilisé pour révéler l'αSMA et la SM-MHC. Les cellules ont été en final contrecolorées avec l'hématoxyline.

Cytométrie de flux

Un aliquot de cellules a été directement marqué avec des anticorps dirigés contre CD31 (5.6E, Coulter), CD45/CD14 (2D1, MφP9, Becton Dickinson), CD56, et CD90. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-Desmine (D33, DAKO) après une

étape de perméabilisation avec le réactif de perméabilisation IntraprepTM (Coulter). Après marquage les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 1 % et analysées par cytométrie de flux (FACStar flow cytometer, Becton Dickinson).

RT-PCR (Transcription inverse-Réaction de polymérisation en chaîne)

5 L'ARN total a été extrait avec le réactif RNAXEL^R (EUROBIO, Les Ulis, France) selon les instructions du fournisseur. La synthèse de l'ADNc a été réalisée avec le kit « 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV) » (Boehringer Mannheim). Par conséquent, le fragment d'ADNc d'intérêt a pu être amplifié par PCR. Le mélange

10 PCR contenait un tampon de réaction 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de mélange de déoxynucléotides, 0,5 unité de Taq polymérase et 0,2 µM d'amorces sens et antisens. Les amorces suivantes ont été utilisées pour la RT-PCR : GAPDH sens : 5' -CCA TGG AGA AGG CTG GGG- 3', antisens : 5' -CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC- 3', calponin sens : 5' -AGA-AGT-ATG-ACC-ACC-AGC- 3', antisens : 5' -TAG-AGC-CCA-ATG-ATG-TTC-CG- 3', SM22α sens : 5' -GCA-GTC-CAA-AAT-TGA-GAA-

15 GA- 3', antisens : 5' -CTG-TTG-CTG-CCC-ATT-TGA-AG- 3', Myogenin sens : 5' -AGC-GCC-CCC-TCG-TGT-ATG- 3', antisens : 5' -TGT-CCC-CGG-CAA-CTT-CAG-C- 3', MyoD sens : 5' -CGG-CGG-CGG-AAC-TGC-TAC-GAA- 3', antisens : 5' -GGG-GCG-GGG-GCG-GAA-ACT-T- 3', Myf5 sens : 5' -ACC-ATG-GAT-CGG-CGG-AAG-G- 3', antisens : 5' -AAT-CGG-TGC-TGC-CAA-CTG-GAG- 3', VEGF-R1

20 sens : 5' -CGA CCT TGG TTG TGG CTG ACT- 3', antisens : 5' -CCC TTC TGG TTG GTG GCT TTG- 3', VEGF-R2 sens : 5' -AAC AAAGTC GGG AGA GGA- 3', antisens : 5' -TGA CAA GAA GTA GCC AGA AGA- 3', SRF sens : 5' -AGT-GTG-TGG-GGG-AGA-TTC-TG- 3' et antisens : 5' -TCT-CCC-TAG-CAA-CAG-CCC-TA-3'.

25

EXEMPLE 1 : Conditions de culture permettant l'obtention en grande quantité, chez l'homme, de CML à partir des cellules progénitrices ou des cellules différenciées du muscle squelettique

A) Population cellulaire de départ :

30 Le procédé de l'invention porte sur un procédé d'obtention d'une population de cellules dont un type cellulaire dominant est le type de cellules musculaires lisses. Ce procédé pourra être appliqué soit directement sur les cellules de biopsies musculaires,

soit après une première phase de différenciation des cellules de la biopsie en CMS et d'amplification de ces cellules. Les conditions d'obtention des biopsies musculaires et des CMS à partir de ces biopsies ainsi que leur caractérisation phénotypique sont définies dans la demande internationale de brevet publiée sous le N° WO 01/94555 (J.P. Marolleau et coll.). De plus, les cellules de la biopsie n'expriment pas CD31 et CD14.

A partir de quelques grammes d'une biopsie musculaire, il est possible d'obtenir plusieurs centaines de millions de CMS. Ces cellules expriment le CD56, la desmine et les gènes de la myogenèse tels que Myf5 et la myogénine. En revanche elles n'expriment pas le CD34, le CD14, et les marqueurs spécifiques des CML tels que : la calponine et la SM-MHC. Ces cellules sont enfin capables de fusionner et de donner naissance à des myotubes multinucléés.

B) Différenciation cellules musculaires squelettiques vers cellules musculaires lisses :

Les cellules de la biopsie, ou après différenciation en CMS, sont mises en culture dans le milieu MCDB ou M199 en présence de VEGF seul ou avec d'autres facteurs de croissance (PDGF-BB, IGF1, FGFb, HGF ou TNF α))

Solutions et milieux utilisés :

Milieu A :

- Milieu MCDB 120 (Ham et al., 1988) modifié : substitution de la L-valine par de la D-valine, élimination du rouge de phénol et de la thymidine.

Milieu B :

- Milieu A + 20 % de sérum de veau fœtal irradié + antibiotique (gentamycine à 50 μ g par ml, ou à 100 UI/ml pour la pénicilline et 100 μ g/ml pour la streptomycine).

Milieu C :

- Milieu B + FGFb (10 ng/ml) + dexaméthasone à 1 μ M.

Solution D : Tampon phosphate salin (PBS)

(voir la demande de brevet internationale publiée sous le No. WO 01/94555 pages 24 et 25).

Milieu E : M199

- Milieu F : M199 + 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté + Hépes (25 mM) + antibiotique (pénicilline, streptomycine et, si nécessaire, un antimycotique (tel que de la fongizone à 25 μ g/ml, ou comme indiqué ci-avant).

Milieu G : Milieu F (M199 + SVF + Hépes + antibiotique) + VEGF (10 ng/ml).

Milieu H : Milieu B (MCDB + SVF + antibiotique + dexaméthasone) + VEGF (10 ng/ml).

Les milieux contenant les différents facteurs de croissance décrits plus haut.

5 L'expression des gènes associés à la différenciation en CMS ou CML, au cours du temps de culture, a été analysée par polymérisation en chaîne après reverse transcription (RT-PCR), cytométrie en flux et immunocytochimie. Ainsi, après un mois de culture dans le milieu M199 ou MCDB 120 contenant du VEGF, ces cellules expriment les ARN messagers et les protéines spécifiques des CML. Elles expriment
10 donc la calponine et la SM-MHC. En parallèle, elles expriment beaucoup moins fortement la desmine et le CD56 et plus du tout MyoD. En revanche, l'expression des facteurs de transcription Myf5 et Myogénine persiste.

Les inventeurs ont également mis en évidence que ces modifications phénotypiques entraînaient des propriétés fonctionnelles différentes.

15

EXEMPLE 2 : Différenciation des cellules musculaires squelettiques en cellules musculaires lisses

Des cellules de biopsie de muscle ont premièrement été mises en culture pour expansion dans un milieu contenant du FGFb tel que décrit précédemment (12). Pour
20 caractériser le phénotype de ces cellules, des analyses en cytométrie en flux (FACS), par réaction de polymérisation en chaîne avec transcription inverse (RT-PCR) et par immunocytochimie ont été réalisées. L'analyse par FACS a démontré que la plupart de ces cellules sont positives pour CD56 (80,30 + 19,50 %), la desmine (92,30 + 8,48 %) et CD90 (91,32 + 10,19 %) et négatives pour le marqueur endothélial CD31, le marqueur
25 de monocytes CD14, et le marqueur de leucocytes CD45 (figure 1A). L'analyse par RT-PCR a démontré que les cellules expriment les marqueurs liés aux cellules myogéniques tels que Myf5, MyoD et Myogenin (figure 1B). Les cellules expriment également des marqueurs spécifiques des cellules du muscle lisse SM22 α (figure 1B) et α SMA (figure 1C). Mais certaines isoformes de cellules de muscle lisse ont été détectées dans des
30 cellules de muscle squelettique en développement ou en régénération (14, 15). Les cellules n'expriment pas de marqueurs de cellules de muscle lisse différenciées tels que la calponine (figure 1B) et SM-MHC (figure 1C).

Les cellules ont ensuite été mises en culture dans un milieu contenant du VEGF (10 ng/ml). Après 7 jours, des changements de morphologie cellulaire ont été observés (figure 2A). La technique de RT-PCR a été utilisée pour comparer les changements d'expression de gènes pendant la culture entre les cellules de muscle squelettique et de muscle lisse. Cette analyse a été réalisée sur de l'ARN obtenu à partir de cellules aux jours 0, 6, 11 ou 12 et 30 après mise en culture, et les résultats sont présentés sur la figure 2B. Il a été observé que les gènes codant pour SM22 α , Myogenin et Myf 5 sont exprimés à un niveau similaire, quelles que soient les conditions de culture et pendant toute la durée de la culture. Les cellules de muscle squelettique (CMS) mises en culture avec du FGFb ne montrent aucune expression de calponine. Mais après un mois de culture avec du VEGF, ces cellules expriment de l'ARNm de calponine et simultanément n'expriment plus MyoD (figure 2B). L'expression de SM-MHC confirme que ces cellules ont adopté un phénotype de cellules de muscle lisse (figure 2C). Du fait de la variabilité dans l'expression de gènes structuraux dans les cellules de muscle lisse (CML), il est généralement soutenu que pour qu'une cellule soit caractérisée comme une CML différenciée, il est nécessaire de démontrer l'expression de plusieurs isoformes de gènes structuraux associés au muscle lisse. Ainsi, l'expression de SM22 α , de la calponine et de SM-MHC dans les CMS est une forte indication que certaines des cellules de la culture ont adopté une identité de CML différenciée. De façon à définir les meilleures conditions de culture, d'autres facteurs de croissance connus pour induire la différenciation ou la prolifération des CML ont été testés. Des conditions de culture dans lesquelles du PDGF BB et/ou du FGFb et/ou du HGF et/ou du TGF β et/ou du IGF1 a été ajouté au VEGF ont donc été testées. Mais aucun effet significatif sur la différenciation de CMS en CML ou sur la prolifération n'a été observé.

Frid M.G. et al. (13) ont démontré que l'endothélium bovin mature contient des cellules qui, *in vitro*, peuvent acquérir un phénotype de CML par un processus de transdifférenciation. Il a été confirmé ici par analyse par FACS que les cellules en culture ne sont pas contaminées par des cellules endothéliales (CE). Elles n'expriment pas de marqueurs liés aux cellules endothéliales tels que CD31 (figure 1A). En outre, on peut faire l'hypothèse que le phénomène observé ne représente pas une simple contamination par des CML provenant d'une source externe. En effet, toutes les

biopsies testées, qui montrent l'expression des gènes associés au muscle squelettique Myogenine, MyoD, Myf5 et Desmine, subissent une différenciation en muscle lisse.

EXEMPLE 3 : Essais fonctionnels

- 5 L'acquisition de marqueurs de cellules de muscle lisse ne signifie par nécessairement que ces cellules sont capables de se différencier en CML matures.

A) Culture en gel de collagène de type I (culture en 3D)

Protocole :

- La culture en gel de collagène de type I (culture en 3D) (BD Biosciences, Bedfoed, MA) a été réalisée selon les recommandations du fournisseur, à savoir :
- 10 - 0,5 ml de collagène de queue de rat de type I à 1 mg/ml (Becton Dickinson) est coulé dans des boîtes de culture de 35 mm de diamètre (Nunc, Fisher Scientific, Elancourt, France) et laissé à polymériser pendant 1 heure à 37°C. 400 000 cellules au total (200 000 de chacun des types cellulaires quand mélange des cellules endothéliales avec
- 15 les cellules musculaires) sont alors déposées à la surface du gel et mises en culture pendant 24 heures dans les différentes conditions de culture. La formation de réseaux vasculaires est ensuite observée au microscope à contraste de phase et avec une caméra « charge-coupled » Kappa CF11DSP.

Résultats (voir figures 3A à 3C) :

- 20 La capacité de ces cellules à s'organiser dans une culture tridimensionnelle de collagène a été analysée. Il a été démontré que les cellules endothéliales (CE) et les CML interagissent entre elles pour former des réseaux de type capillaire *in vitro* en culture tridimensionnelle. La capacité de CMS cultivées avec du FGFb, et de CMS cultivées avec du VEGF à s'associer avec des CE et à former des réseaux de type
- 25 capillaire *in vitro* a été comparée. On observe que les CMS cultivées avec du VEGF sont capables d'interagir avec les CE formant des réseaux tubulaires compacts (figure 3C), alors que les CMS cultivées avec du FGFb n'interagissent pas avec les CE dans les mêmes conditions et ne forment aucun réseau de vaisseaux (voir figure 3B).

B) Modèle matrigel

- 30 La capacité de chaque type cellulaire, CMS avec FGFb ou avec VEGF, à former des structures de vaisseaux tubulaires dans un modèle d'implant matrigel dans des souris NOD-SCID immunodéprimées a été testée.

Protocole :

J0 : Un implant de 0,2 ml de matrigel (BD Biosciences) (contenant 0,5 mg/ml de FGFb) est injecté en sous-cutané sur le dos des souris immunodéprimées NOD-SCID.

J1 : Le matin, les souris sont irradiées de façon sub-létale (325 rad). L'après
5 midi, 500 000 cellules sont injectées en intraveineux via la veine caudale.

J10 : Les animaux sont sacrifiés, l'implant est récupéré et inclus en paraffine. Une coloration HES (hémaline, éosine, safran) a été réalisée puis examinée (grandissement 4x, 40x).

Résultats (voir figures 4A à 4C) :

10 Ces résultats ont été obtenus et reproduits à partir de CMS provenant de 3 patients différents ou à partir de biopsies issues de 5 patients différents.

Dans l'implant matrigel, l'administration de CE et de CML ou de CE et de CMS cultivées avec du VEGF conduit à la formation de nombreuses structures de type tubulaire et la présence d'érythrocytes est mise en évidence dans la lumière, démontrant
15 l'existence d'une structure vasculaire fonctionnelle (figures 4B et 4C). Inversement, l'administration de CE et de CMS cultivées avec du FGFb ne conduit à la formation d'aucune structure de type tubulaire et induit la formation d'agrégats de cellules désorganisés (figure 4A).

C) Les CMS cultivées en présence de VEGF ne fusionnent plus en myotubes multinucléés
20

(Voir figures 5A à 5F)

La fusion des myoblastes individuels en myotubes multinucléés constitue la différenciation terminale des CMS. La formation de myotubes a été examinée en mettant en culture des CMS, avec du FGFb ou du VEGF, à la même densité initiale, et
25 en changeant ensuite les conditions de culture pour un milieu avec 2 % de sérum de veau fœtal. Dans ces conditions, des myotubes apparaissent 10 jours après la mise en culture. Contrairement aux CMS cultivées avec du FGFb (figure 5B), les CMS cultivées avec du VEGF (figure 5D), de même que les CML (figure 5F), sont incapables de fusionner en myotubes multinucléés. Ces cellules ont donc perdu la capacité à former
30 des myotubes multinucléés.

D) Le VEGF est impliqué dans l'induction de la transition du phénotype CMS à CML en augmentant l'expression du facteur de réponse sérique FRS (dénommé aussi SRF pour « serum response factor »)

Le VEGF est un régulateur majeur de la formation des vaisseaux sanguins pendant le développement de l'organisme et chez l'adulte. Afin d'explorer la voie de transduction du signal possible pour le VEGF, l'expression des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 a été analysée dans les CMS et les CML. L'analyse par RT-PCR met en

5 évidence que les CMS expriment une grande quantité de VEGFR2. Mais lorsque ces cellules sont cultivées dans un milieu contenant du VEGF une diminution de l'expression de VEGFR2 est observée (figure 6). Et, quelles que soient les conditions de culture, nous n'avons pas mis en évidence la détection d'expression de VEGFR1. Ces résultats suggèrent ainsi le rôle de VEGFR2 dans la médiation de la transdifférenciation

10 des CMS en CML stimulée par le VEGF. Le FRS est un régulateur clé de nombreux gènes de réponse précoce cellulaire qui sont connus pour être impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Certains résultats suggèrent qu'un ou plusieurs cofacteurs de FRS restreints à la lignée CMS ou CML pourraient fonctionner en concert avec le FRS pour activer la transcription de gènes restreints à des lignées. Dans le but de

15 comprendre les mécanismes intervenant dans la différenciation des CMS en CML, l'expression de FRS a été comparée dans les cellules avant et après addition de VEGF. Il a été observé que lorsque les CMS sont cultivés dans un milieu contenant du VEGF l'expression de l'ARNm FRS était augmentée (figure 6).

Références

- 1: Gussoni E. et al. : Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999, 401:390-394.
- 2: Jackson KA. Et al. From the cover : hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999, 96:14482-14486.
- 3: Tamaki T. et al. : Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002 ; 157:571-577.
- 4: Hwang JH. et al. : Differentiation of stem cells isolated from rat smooth muscle. *Mol Cells* 2004 ; 17(1):57-61.
- 5: Benjamin L.E. et al. : Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999 ; 103:159-165.
- 6: Morikawa S. et al. : Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002 ; 160:985-1000.
- 7: Berger M. et al. : Regulator of G protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 2004 epub le 30/09/04.
- 8: Bergers G. et al. : benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003 ; 111:1287-1295.
- 9: Jain R.K. : Normalizing of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005 ; 307:58-62.
- 10: Ganss R. et al. : Combination of T-Cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 2002 ; 62:1462-1470.
- 11: Rajantie I. et al. : Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004 ; 104:2084-2086.
- 12: Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1078-1083 (2003).
- 13: Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelium-mesenchymal transdifferentiation. *In vitro analysis.* *Circ. Res.* 90, 1189-1196 (2002).

- 14: Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ. Res.* 78, 188-195 (1996).
- 15: Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O,
5 Jackson B, Gabbiani B. α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 39, 151-166 (1998).
- 16: Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Contreres JO, et al. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovas. Res.* 62, 176-184 (2004).

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention *in vitro* d'une population de cellules comprenant essentiellement des cellules musculaires lisses humaines (hCML) exprimant la calponine et la SM-MHC à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine ou à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS),
 - lesdites cellules de biopsies musculaires humaines n'exprimant pas le CD31 et le CD14, et, le cas échéant, les marqueurs des lymphocytes B et T, et
 - lesdites hCMS exprimant le CD56, la desmine et un gène de la myogénèse choisi dans le groupe de gènes constitué du gène MyoD, Myf5 et la myogénine, et sont capables de générer des myotubes multinucléés, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - A) la mise en culture desdites cellules de biopsies musculaires humaines myoblastiques dans un milieu de culture comprenant du VEGF, ladite culture étant réalisée en absence de CML issues de vessie ; et
 - B) la récupération des hCML obtenues à l'étape A).
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites hCMS exprimant le CD56 et la desmine, expriment les gènes MyoD, Myf5 et la myogénine.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites hCMS n'expriment pas le CD34 et le CD14.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites hCMS n'expriment pas la calponine et la SM-MHC.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites hCML obtenues à l'étape A) expriment la calponine et la SM-MHC.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lesdites hCML obtenues à l'étape A) n'expriment pas le gène MyoD.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdites hCML obtenues à l'étape A) à partir de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS), expriment le CD56 et la desmine en quantité significativement moins importante que lesdites cellules hCMS utilisées à l'étape A).
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que lesdites hCML obtenues à l'étape A) expriment Myf5 et la myogénine.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit milieu de culture utilisé à l'étape A) comprend en outre au moins un facteur de croissance choisi dans le groupe de facteurs de croissance constitué du PDGF-BB, IGF1, FGFb, HGF, TNF α , TGF β et tous autres facteurs pouvant avoir un rôle sur la prolifération ou la différenciation des CML.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 dans lequel procédé lesdites hCML sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS), caractérisé en ce que lesdites hCMS sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsie musculaire humaine par un procédé comprenant les étapes suivantes :
- éminçage de ladite biopsie musculaire,
 - dissociation enzymatique des fibres et cellules musculaires et séparation des cellules individualisées par filtration,
 - mise en culture des cellules d'origine musculaire ainsi obtenues dans un réacteur de culture de cellules adhérentes en présence d'un milieu de croissance et/ou de différenciation suivie le cas échéant d'une ou plusieurs phases d'expansion,
 - identification des types cellulaires présents aux différents stades de la culture par l'analyse de marqueurs cellulaires spécifiques,
 - choix du stade de culture pendant lequel le type cellulaire recherché est en proportion dominante dans la population de cellules,
 - récolte d'une population de cellules au stade de culture choisi en e),
 - le cas échéant, congélation des cellules récoltées à l'étape f).

11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que :

- à l'étape b), on effectue :

- un lavage des éminçats dans un milieu A suivi de la dissociation enzymatique en présence de libérase dudit éminçat ;

5 - la séparation des cellules individualisées ainsi obtenues par filtration sur tamis suivie d'une centrifugation ; et

- le lavage dans un milieu B du culot cellulaire ainsi obtenu ;

- à l'étape c), on effectue :

10 - la mise en culture des cellules obtenues à l'étape b) sur un plateau de culture dans un milieu C jusqu'à obtenir un degré de confluence d'environ 20 à 50 % ou jusqu'à l'apparition des premiers myotubes, puis le lavage des cellules en tampon PBS, en SVF puis en milieu C, la culture en milieu C) sur des unités de plateaux élargis ou multi-étagés pouvant être de nouveau réalisée pour atteindre un degré de confluence d'environ 90 % ou l'apparition des premiers myotubes,

15 - l'élimination du milieu de culture C et son remplacement par un milieu D la veille de la récolte desdites cellules,

- le lavage des cellules ainsi obtenues en PBS puis en milieu A; et,

- le cas échéant, la concentration desdites cellules ainsi obtenues en milieu A supplémentée de sérum albumine humaine à 0,5 % (P/V) à la fin de l'étape f) ;

20 - à l'étape g), la congélation desdites cellules ainsi obtenues à l'étape f) est réalisée en milieu A supplémentée de sérum albumine humaine à 4 % (P/V) et en DMSO à 7,5 % (V/V), leur décongélation à 37°C, et après un lavage en milieu A leur suspension dans le milieu de culture,

et dans lesquelles étapes lesdits milieux A, B, C et E sont les suivants :

25 Milieu A :

- Milieu MCDB 120 (Ham et al., 1988) modifié : substitution de la L-valine par de la D-valine, élimination du rouge de phénol et de la thymidine,

Milieu B :

- Milieu A + 20 % de sérum de veau fœtal irradié + antibiotique,

30 Milieu C :

- Milieu B + FGFb (10 ng/ml) + dexaméthasone à 1 μ M,

Solution ou milieu D : Tampon phosphate salin (PBS).

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le stade de culture pendant lequel le type cellulaire hCMS recherché est en proportion significative dans la population de cellules est déterminé par l'apparition d'une population cellulaire de phénotypes CD56+ représentant au moins 50 % de la population générale.
- 5
13. Procédé selon la revendication 12 dans lequel ladite population cellulaire de phénotypes CD56+ représentant au moins 50 % de la population générale possède en outre l'un au moins des phénotypes, de préférence au moins 2, 3 et les 4 phénotypes, choisi dans le groupe de phénotypes constitué de CD10+, CD13+, desmine+ et HLA de classe 1.
- 10
14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13 dans lequel procédé lesdites hCML sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsies musculaires humaines différenciées *in vitro* en cellules musculaires squelettiques (hCMS), caractérisé en ce que à l'étape A), ledit milieu de culture comprenant du VEGF est le milieu MCDB 120 modifié par substitution de la L-valine par la D-Valine, élimination du rouge de phénol et de la thymidine.
- 15
15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 dans lequel procédé lesdites hCML sont obtenues à partir d'un échantillon de cellules de biopsies musculaires humaines, caractérisé en ce que à l'étape A), ledit milieu de culture comprenant du VEGF est le milieu M199.
- 20
16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15 dans lequel procédé à l'étape A), ledit milieu de culture comprend 10 ng/ml de VEGF.
- 25
17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que la biopsie musculaire humaine à partir de laquelle lesdites hCML sont obtenues directement ou préalablement prédifférenciées en hCMS, est une biopsie prélevée dans tout territoire musculaire de l'individu chez qui le prélèvement est effectué.
- 30
18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la biopsie musculaire humaine à partir de laquelle lesdites hCMLs sont obtenues directement ou

préalablement prédifférenciées en hCMS, est une biopsie prélevée dans le territoire musculaire de la jambe de l'individu chez qui le prélèvement est effectué.

19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que la biopsie musculaire humaine à partir de laquelle lesdites hCML sont obtenues directement ou
5 préalablement prédifférenciées en hCMS, est une biopsie prélevée dans le territoire musculaire d'un individu enfant ou adulte.
20. Cellules musculaires lisses humaines isolées susceptibles d'être obtenues par le
10 procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisées en ce qu'elles expriment la calponine et la SM-MHC.
21. Composition comprenant des cellules musculaires lisses humaines isolées selon la revendication 20 ou obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 19, à
15 titre de médicament.
22. Utilisation d'une composition selon la revendication 21 pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à l'Homme.
- 20 23. Utilisation d'une composition selon la revendication 21 ou 22 pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à l'individu dont est originaire la biopsie.
24. Utilisation selon l'une des revendications 22 ou 23, pour la préparation d'une
25 composition thérapeutique destinée au remplacement de CML.
25. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 24, pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à la prévention ou au traitement de l'athérosclérose, des arthérites, des maladies veineuses chroniques, des malformations vasculaires, en
30 particulier des angiomes.
26. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 24, pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à la prévention ou au traitement de cancers en

administration préalable ou simultanée à un traitement anti-cancéreux par chimiothérapie ou par radiothérapie.

27. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 24, pour la préparation d'une
5 composition thérapeutique destinée à la prévention ou au traitement de l'ischémie, en particulier cardiaque ou des membres inférieurs.
28. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 24, pour la préparation d'une
10 composition thérapeutique destinée à la prévention ou au traitement de maladie nécessitant un traitement par un principe actif, caractérisée en ce que lesdites CML contiennent ledit principe actif.
29. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 28, pour la préparation d'une
15 composition thérapeutique destinée à être administrée par voie intra-veineuse ou par transplantation.

1/7

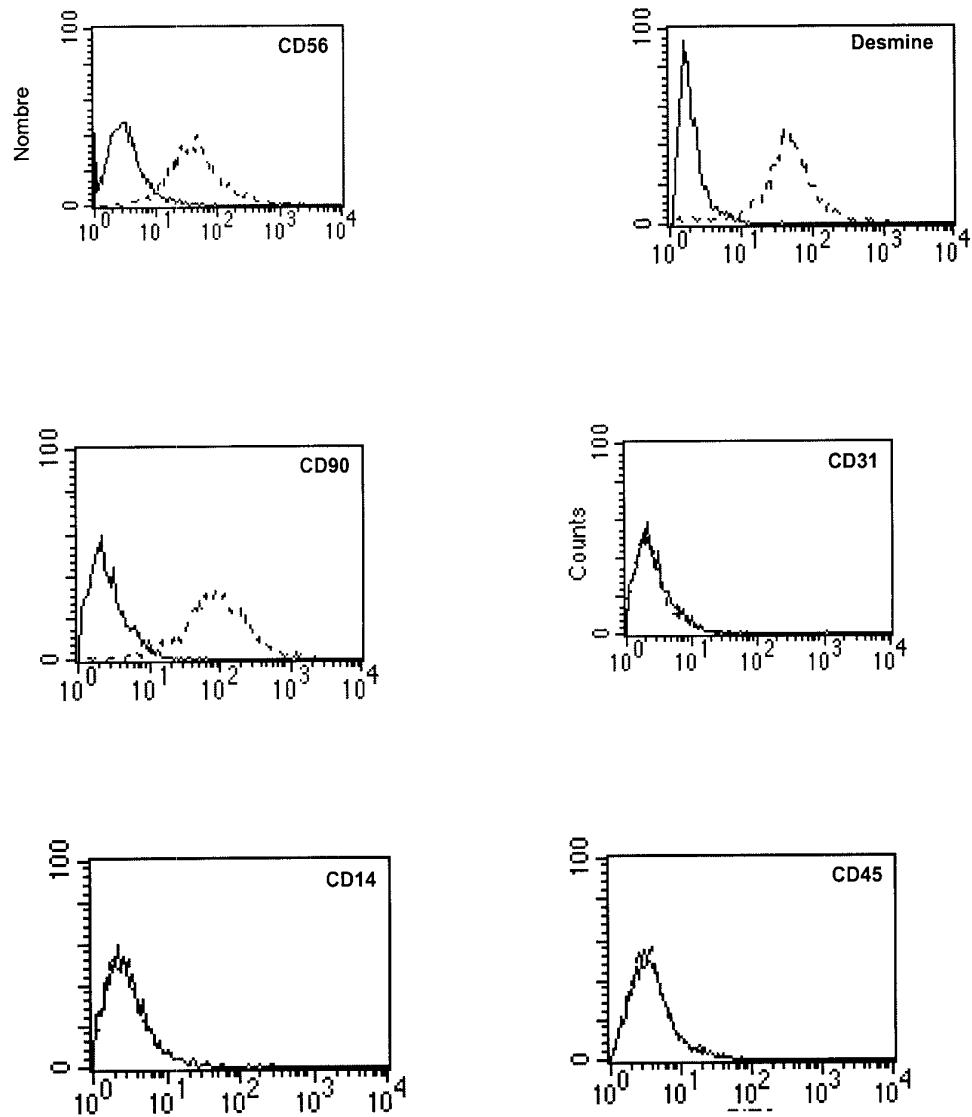


FIGURE 1A

2/7

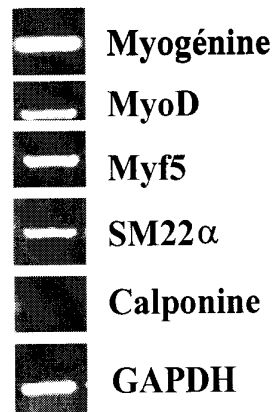


FIGURE 1B

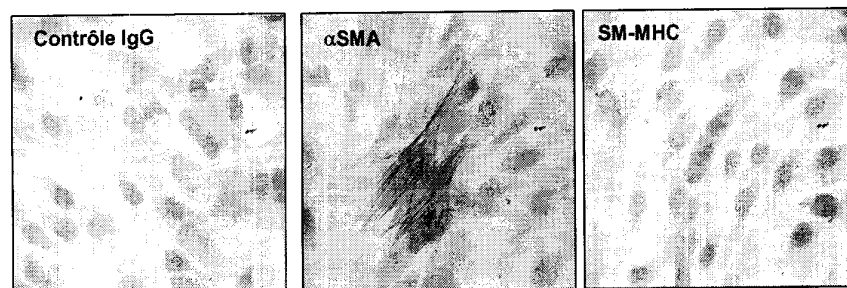


FIGURE 1C

3/7

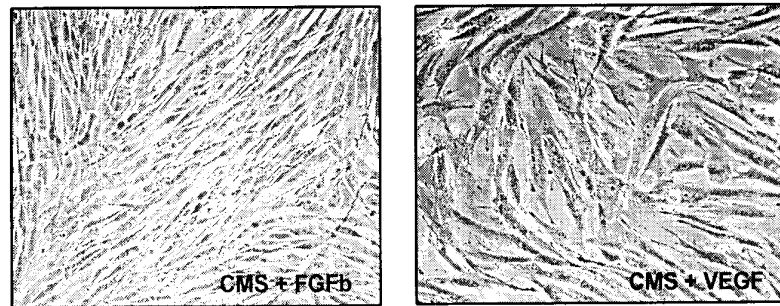


FIGURE 2A

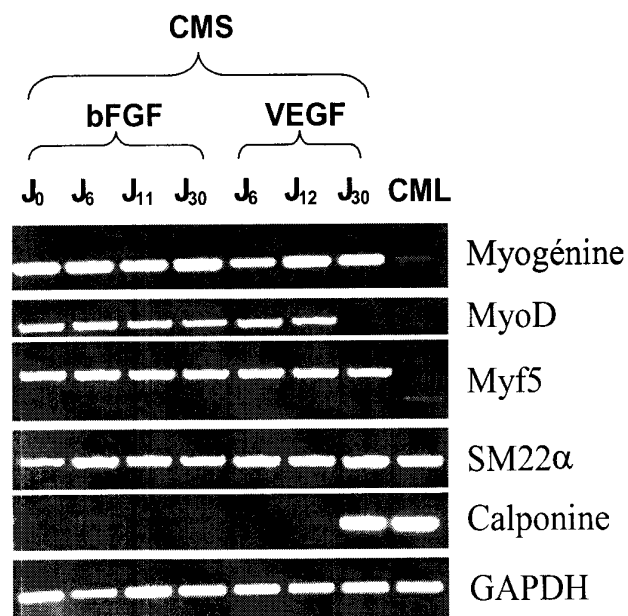


FIGURE 2B

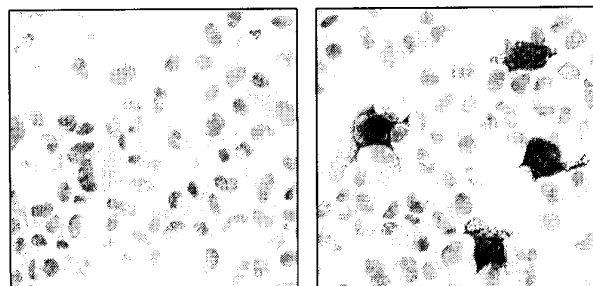
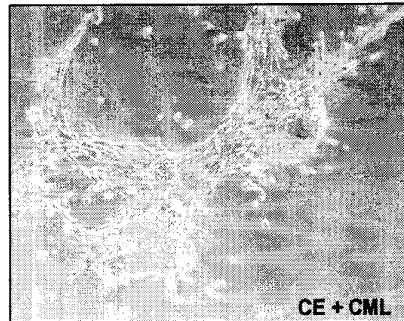
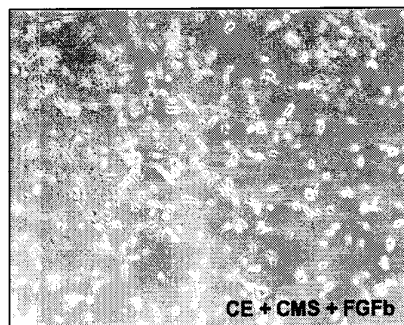
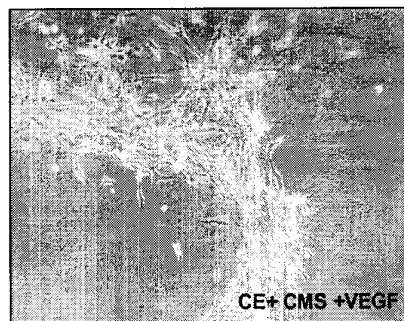


FIGURE 2C

4/7

**FIGURE 3A****FIGURE 3B****FIGURE 3C**

5/7

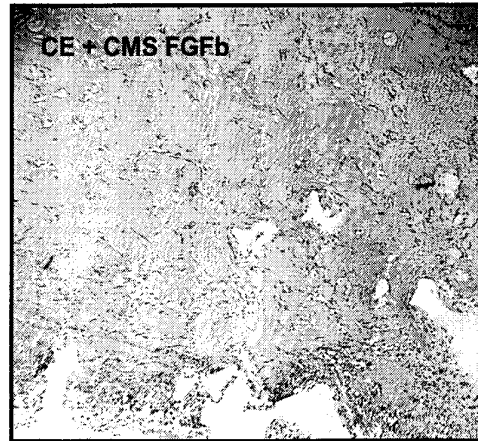


FIGURE 4A

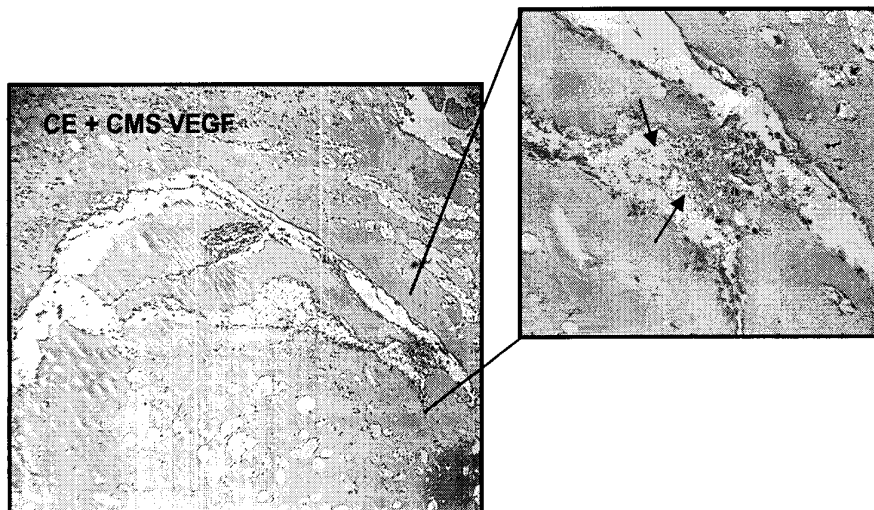


FIGURE 4B

FIGURE 4C

6/7

20% SVF

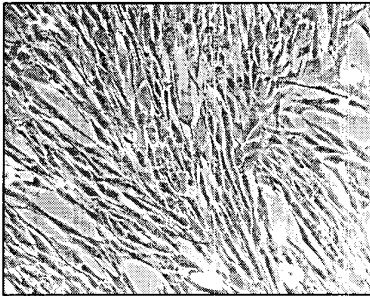


FIGURE 5A

2% SVF

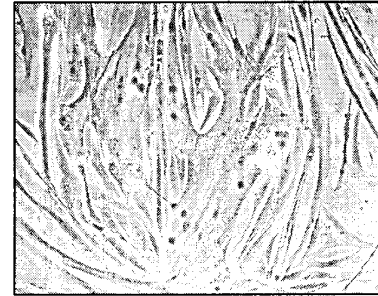


FIGURE 5B

CMS + FGFb

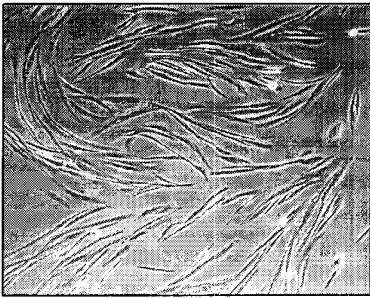


FIGURE 5C

CMS + VEGF

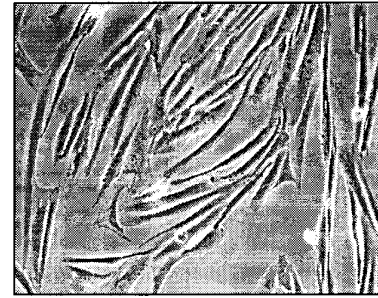


FIGURE 5D

CML + VEGF



FIGURE 5E



FIGURE 5F

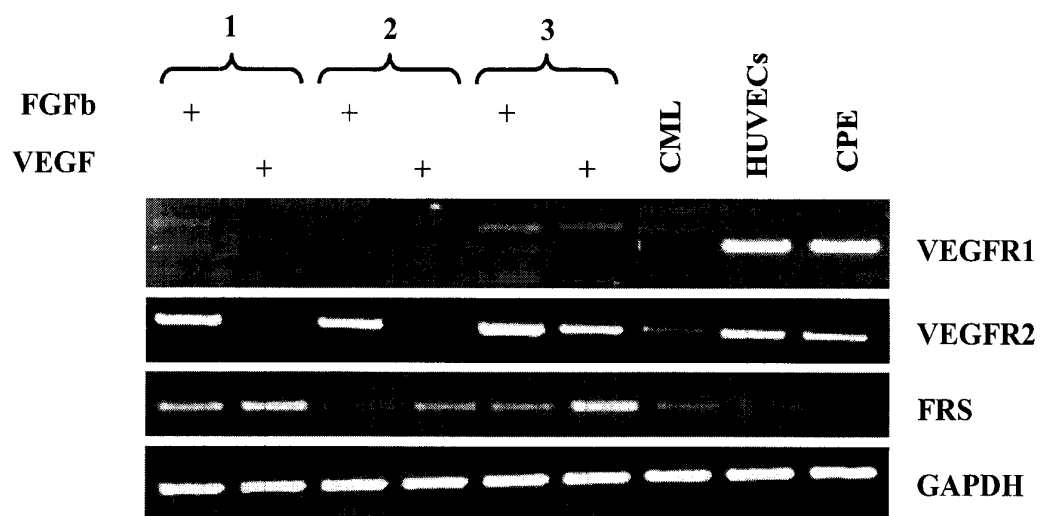


FIGURE 6



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 674579
FR 0509557

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,X	<p>LE RICOUSSE-ROUSSANNE SOPHIE ET AL: "Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature." CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 62, no. 1, 1 avril 2004 (2004-04-01), pages 176-184, XP002387433 ISSN: 0008-6363 * figure 1 * * figure 2 * * figure 5 * * page 179, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 * * page 180, colonne de droite, alinéa 1 * * page 183, colonne de droite, alinéa 1 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	20-22, 26,28,29	<p>C12N5/08 A61K9/10 A61P9/10 A61P35/00</p>
X	<p>SIMPER DAVID ET AL: "Smooth muscle progenitor cells in human blood." CIRCULATION, vol. 106, no. 10, 3 septembre 2002 (2002-09-03), pages 1199-1204, XP002387434 ISSN: 1524-4539 * page 1201, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 * * figure 2 * * figure 4 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	20-25, 27-29	
D,A	<p>HWANG JI HYE ET AL: "Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation [corrected]." MOLECULES AND CELLS, vol. 17, no. 1, 29 février 2004 (2004-02-29), pages 57-61, XP002387435 ISSN: 1016-8478 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-19	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 juin 2006		Manu, D	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> </div> </div>			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 674579
FR 0509557

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	QU-PETERSEN Z ET AL: "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: Potential for muscle regeneration" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 157, no. 5, 27 mai 2002 (2002-05-27), pages 851-864, XP002302343 ISSN: 0021-9525 * page 857, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 1 * -----	1-19	
A	HUARD J ET AL: "Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 9, no. 23, décembre 2002 (2002-12), pages 1617-1626, XP002370482 ISSN: 0969-7128 * le document en entier * -----	1-19	
D,A	WO 01/94555 A (ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE) 13 décembre 2001 (2001-12-13) * le document en entier * -----	1-19	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 juin 2006		Manu, D	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> </div> </div>			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0509557 FA 674579

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **27-06-2006**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0194555 A	13-12-2001	AU 6612701 A	17-12-2001
		BR 0111497 A	06-04-2004
		CA 2411762 A1	13-12-2001
		EP 1292671 A1	19-03-2003
		FR 2810045 A1	14-12-2001
		JP 2003535586 T	02-12-2003
		US 2006088508 A1	27-04-2006
		US 2004043008 A1	04-03-2004
