

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.07.01.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 10.01.03 Bulletin 03/02.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE REGIONAL DE LUTTE  
CONTRE LE CANCER - CENTRE FRANCOIS  
BACLESSE — FR.

⑦② Inventeur(s) : POULAIN LAURENT, STAEDEL  
CATHY, GAUDUCHON PASCAL, ERBACHER  
PATRICK et BEHR JEAN PAUL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ PRODUITS APTES A TRAITER LES CANCERS DE L'OVAIRE ET A EN PREVENIR LES RECHUTES.

⑤⑦ Produits aptes à traiter les cancers de l'ovaire et à en  
prévenir les rechutes.

Lesdits produits contiennent (1) un vecteur d'acide nucléique non viral comprenant au moins une polyéthylène imine (PEI) de poids moléculaire inférieur à 25 kDa, (2) une séquence d'acide nucléique comprenant le gène bcl-xS ou un fragment fonctionnel de celui-ci et (3) au moins un agent anti-tumoral actif sur le cancer de l'ovaire, comme préparation combinée pour une utilisation séquentielle dans le traitement des cancers de l'ovaire, la séquence d'acide nucléique associée audit vecteur d'acide nucléique non viral étant administrée après le composé anti-tumoral.



**PRODUITS APTES A TRAITER LES CANCERS DE L'OVAIRE ET A EN  
PREVENIR LES RECHUTES.**

La présente invention est relative à des produits aptes à traiter les cancers de l'ovaire et à en prévenir les rechutes.

5 Les cancers de l'ovaire représentent la première cause de mortalité par cancer gynécologique et se placent au quatrième rang des causes de décès par cancer chez la femme et leur incidence ne fait que progresser (de l'ordre de 4 % par an). La gravité de ces cancers est liée en particulier à leur découverte tardive et à leur capacité à développer une forte chimiorésistance au cours des cycles de chimiothérapie, ce qui fait que le taux de mortalité suite à ce cancer a peu évolué durant ces  
10 quinze dernières années.

En France, le taux d'incidence du cancer de l'ovaire est estimé à 11,1/100.000 et s'accroît avec l'âge.

L'étiologie des cancers de l'ovaire est peu connue ; la majorité de  
15 ces cancers est due à une transformation maligne de l'épithélium ovarien (cancers épithéliaux). Ils présentent des propriétés particulières de croissance : ils peuvent se présenter à la fois sous forme de tumeurs solides envahissant l'ovaire, de sphéroïdes multicellulaires en suspension dans un liquide d'ascite dans la cavité péritonéale ou sous forme de nodules disséminés sur le péritoine. La dissémination se réalise égale-  
20 ment par voie lymphatique ou sanguine, provoquant l'apparition de métastases ganglionnaires, pulmonaires ou hépatiques.

Leur thérapie usuelle associe la chirurgie et une chimiothérapie basée essentiellement sur les sels de platine, tels que le cisplatine (cis-dichloro-diamino-platine (II) ou CDDP) ou le carboplatine (diaminecyclobutane-dicarboxylo-  
25 platine ou CBDCA), analogue du cisplatine, dont l'équivalence de dose a été établie (rapport CBDCA/CDDP de 4).

Les différentes polychimiothérapies utilisant l'un des dérivés du platine ont constitué un progrès majeur dans le traitement de ces tumeurs. Aussi bien le cisplatine que le carboplatine sont administrés à des doses allant, selon le produit et  
30 selon les cas, de 100 à 650 mg/m<sup>2</sup> par mois, sous la forme de perfusions en 1 à 24 heures (Poulain et al., *Int. J. Cancer*, 1998, **78**, 454-463, M. Marone et al., *Clin. Cancer Res.*, 1998, **4**, 517-524, J.R. Liu et al., *Gynecol. Oncol.*, 1998, **70**, 398-403,

J.K. Taylor et al., *Oncogene*, 1999, **18**, 4495-4504, et J.K. Taylor et al., *Nature Biotechnol.*, 1999, **17**, 1097-1100).

Dans les polychimiothérapies, les principaux médicaments actuellement utilisés sont outre les dérivés du platine, les agents alkylants, tels que le méphalan, le chlorambucil, le cyclophosphamide ou le thiotepa, les anthracyclines, telles que  
 5 l'adriamycine ou les taxanes. Les associations de polychimiothérapie suivantes sont de préférence préconisées : CDDP 100 mg/m<sup>2</sup>-cyclophosphamide 600 mg/m<sup>2</sup>, paclitaxel-carboplatine, cisplatine-carboplatine ou cisplatine 100 mg/m<sup>2</sup>-cyclophosphamide 300 mg/m<sup>2</sup>-carboplatine 300 mg/m<sup>2</sup>.

10 L'exérèse, aussi complète que possible, conditionne l'efficacité des traitements adjuvants. Elle est classiquement suivie de 4 à 6 cures de chimiothérapie, espacées de 28 jours, comprenant principalement, en association ou non, les produits précités et notamment des sels de platine, du cyclophosphamide et de l'adriamycine. La radiothérapie peut également intervenir, en particulier au niveau de zones massi-  
 15 vement atteintes.

Les carcinomes ovariens sont généralement sensibles à la chimiothérapie de première ligne mais paradoxalement la survie des patientes reste courte, du fait de l'acquisition de la chimiorésistance au cours des traitements, dans la très grande majorité des cas.

20 Les mécanismes de résistance sont notamment décrit dans Poulain et al., 1998 (précité) ; ils concernent plus précisément :

- l'altération de l'incorporation intracellulaire du CDDP, par diminution de l'incorporation intracellulaire de platine ou par élévation des taux intracellulaires de composés soufrés (glutathion, thiorédoxine),
- 25 - les modifications des systèmes de réparation de l'ADN,
- des altérations mitochondriales ou
- des altérations dans l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle et/ou de la régulation de l'apoptose.

En particulier, le rôle des gènes homologues de la famille *Bcl-2* dans  
 30 le cycle cellulaire et le contrôle de l'apoptose est mis en avant pour expliquer une partie des mécanismes de chimiorésistance :

. la surexpression de Bcl-2 est corrélée à la chimiorésistance de divers types de tumeurs, dont les cancers de l'ovaire.

. la protéine Bcl-x, présente deux isoformes issues d'un épissage alternatif : Bcl-xL, qui a une fonction anti-apoptotique, similaire à celle de Bcl-2 et  
5 Bcl-xS (Brevet US 5,834,309), qui a une fonction pro-apoptotique.

. l'acquisition de la résistance au cisplatine, associée à la capacité des cellules traitées à progresser dans le cycle cellulaire au-delà de la phase G1 : le défaut observé dans la régulation du cycle cellulaire pourrait intervenir au niveau de l'inhibiteur de cdk p21<sup>CIP1/WAF1</sup>. En effet, le cisplatine exerce son effet cytotoxique en  
10 induisant une mort cellulaire par apoptose, résultant d'un dommage létal de l'ADN ; de plus, ce médicament interrompt la progression cellulaire et conduit ainsi à une accumulation des cellules dans des phases spécifiques du cycle, généralement avant l'apoptose. On observe un dysfonctionnement du métabolisme de la p53 nucléaire de l'inhibiteur de cdk p21<sup>CIP1/WAF1</sup> dans les cellules résistantes au cisplatine.

15 Une diminution de la sensibilité à la chimiothérapie est liée à l'altération des taux de Bcl-2, Bax ou Bcl-x, qui interviennent dans le mécanisme de l'apoptose (M. Marone et al., *Clin. Cancer Res.*, 1998, 4, 517-524).

Le gène Bcl-2 (pour *B cells lymphomas*) a été découvert grâce à son expression constitutive dans certains lymphomes folliculaires humains du fait d'une  
20 translocation t(14,18) (q32,q32) le plaçant à proximité du promoteur fort du gène des immunoglobulines. La protéine Bcl-2 protège la cellule contre l'apoptose induite par une large gamme de stimuli. Elle est exprimée dans la membrane externe mitochondriale, le réticulum endoplasmique, et l'enveloppe nucléaire. Les protéines de la famille Bcl-2 présentent une homologie de structure plus ou moins étendue, parfois même restreinte à deux domaines particuliers BH1 et BH2, impliqués dans la dimérisation de ces protéines, qui constitue un élément essentiel de la régulation de leur activité : ces protéines peuvent avoir des rôles opposés, puisque certaines interviennent dans l'induction de l'apoptose (Bax, Bcl-xS, Bad, Bak, Bik), alors que d'autres (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, Bfl1, A1) sont impliquées dans sa répression. Leur homo- ou dimérisation permet un déplacement d'équilibre d'une situation de survie et de croissance  
30 cellulaire vers une induction de la mort cellulaire programmée (J.R. Liu et al.,

*Gynecol. Oncol.*, 1998, 70, 398-403 ; J.K. Taylor et al., *Nature Biotechnol.*, 1999, 17, 1097-1100).

La résistance à l'apoptose, qui joue un rôle important dans les tumeurs qui sont réfractaires à une chimiothérapie, est régulée par le rapport protéines anti-apoptotiques/protéines pro-apoptotiques.

J.K. Taylor et al., *Nature Biotechnol.*, (précité), émettent l'hypothèse qu'en manipulant les taux de ces différentes protéines, les cellules peuvent devenir sensibles à l'apoptose, en réponse aux agents anti-tumoraux. Ils montrent en particulier qu'en modifiant le rapport Bcl-xL/Bcl-xS dans la cellule, en utilisant un oligonucléotide anti-sens, on peut obtenir une sensibilisation des cellules à l'apoptose.

Compte tenu du fait qu'une surexpression de Bcl-xL est associée à une diminution de l'apoptose dans les tumeurs, à une résistance aux agents anticancéreux et à une évolution clinique défavorable, ils émettent l'hypothèse qu'une intervention pharmacologique qui diminue les taux de Bcl-xL et augmente les taux de Bcl-xS pourrait constituer une chimiothérapie alternative intéressante.

Dans ce contexte, l'utilisation des membres de cette famille a été préconisée à des fins thérapeutiques.

Il a été proposé, pour augmenter l'expression de Bcl-xS, d'inhiber l'utilisation du site d'épissage 5' dans l'exon II de l'ARN *bcl-xL*, de manière à rediriger la machinerie d'épissage, à l'aide d'oligonucléotides antisens (J.K. Taylor et al., *Nature Biotechnol.*, 1999, précité) : des cellules A549 (lignées de cellules carcinomes de poumons humains), transfectées par de la lipofectine (contrôle), l'oligonucléotide ISIS 22783 (Brevet US 6,172,216) en présence de lipofectine ou un oligonucléotide contrôle en présence de lipofectine montrent que 1 Le traitement des cellules avec l'oligonucléotide ISIS 22783, qui cible l'exon 1 du transcrit Bcl-xL et est capable de modifier le rapport Bcl-xS/Bcl-xL de 17 % à 293 % sans réduire la quantité d'ARN *Bcl-x* totale dans les cellules A549, entraîne une augmentation d'un facteur 2 de l'apoptose, après traitement avec du cisplatine.

Toutefois, ce document J.K. Taylor et al. ne permet pas de conclure : à l'effet de Bcl-xS ; en effet, il est notamment précisé dans cet article que compte tenu d'autres essais, dans lesquels on obtenait la même stimulation de l'apoptose, uniquement par diminution de la Bcl-xL, il semblerait que la diminu-

tion du taux de Bcl-xL a un effet plus significatif sur l'induction de l'apoptose que l'augmentation de l'expression de Bcl-xS et

. au rôle de Bcl-xS dans les tumeurs ovariennes ; en effet, aucune des cellules mises en œuvre dans ce document ne provient de tumeurs ovariennes.

5 D'autres traitements ont également été proposés :

- J.S. Han et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 1998, 19, 279-288 préconisent d'utiliser un vecteur viral (adénovirus) exprimant le gène *bcl-xS*, qui diffuse uniquement à des distances limitées dans les tumeurs solides et qui est un inhibiteur fonctionnel de Bcl-2 et de Bcl-xL. L'utilisation d'un tel vecteur est parti-  
10 culièrement recommandée, du fait de ses propriétés de faible diffusion, dans le traitement des cancers qui induisent une dissémination dans une cavité : vessie, cancer ovarien (cavité péritonéale).

- A.P. Simoes-Wust et al., *Int. J. cancer*, 2000, 87, 582-590 décrivent un traitement anti-sens *bcl-xL* pour induire l'apoptose dans les cancers du sein (carci-  
15 nomes). L'oligonucléotide utilisé est le 2'-O-méthoxy-éthoxy nucléotide 4259 qui cible les nucléotides 687-706 de l'ARNm *bcl-xL*, une séquence qui ne se retrouve pas dans le transcrit pro-apoptotique *bcl-xS*. Un tel oligonucléotide présente plusieurs avantages : il est spécifique de *bcl-xL*, les modifications aux extrémités 5' et 3' par des résidus 2'-MOE lui permettant de présenter une affinité significativement augmentée  
20 pour sa cible et une stabilité dans le sérum. Le traitement de cellules MCF7 avec cet oligonucléotide 4259 à une concentration de 600 nM pendant 20 heures diminue les taux d'ARNm *bcl-xL* et de protéine correspondante de 80 % et de 50 %, respectivement.

Ce type de traitement est préconisé exclusivement dans les cancers  
25 du sein, dans la mesure où l'expression de Bcl-2 et de Bcl-xL (membres anti-apoptotiques de la famille) est souvent augmentée dans les cancers primaires du sein.

En ce qui concerne le protocole mis en œuvre, il est précisé que l'oligonucléotide est administré sous la forme d'un complexe avec la lipofectine.

- P.J. Beale et al., *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 2, 436-440 Dans cet  
30 article, les Auteurs ont cherché à déterminer si les taux des protéines de la famille Bcl-2 sont corrélés avec la sensibilité ou la résistance au traitement avec les dérivés du platine, dans des tumeurs ovariennes (carcinomes). Ils considèrent en particulier que :

(1) la surexpression de la protéine Bcl-2 dans les tumeurs ovariennes confère une sensibilité au cisplatine, plutôt qu'une résistance ;

(2) on n'observe aucune corrélation significative lorsque l'on compare la sensibilité au cisplatine *in vitro* aux taux de Bax, Bcl-xL ou Bak ;

5 (3) l'introduction de Bax, dans des lignées résistantes au cisplatine ou de Bcl-xL dans des lignées sensibles n'entraîne pas de modifications significatives de la chimiosensibilité.

D'autres traitements pour pallier le phénomène de chimiorésistance, préconisent de potentialiser la cytotoxicité du cisplatine et du carboplatine dans les  
10 cancers de l'ovaire, ce qui permet de récupérer une sensibilité au traitement :

. par l'amphotéricine B (Poulain et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997, 40, 385-390) ; toutefois, l'association cisplatine-AmB est trop néphrotoxique pour une utilisation clinique, alors que l'association carboplatine-AmB ne présente pas une telle néphrotoxicité. D'autres modulateurs, tels que les méthyl-  
15 xanthines, sont préconisés, en association à l'AmB, pour atténuer la néphrotoxicité de l'association cisplatine-AmB ou

. par le gène *cip1-waf1* (Lincet et al., *Cancer Letters*, 2000, 161, 17-26).

Toutefois, les différents traitements préconisés dans l'art antérieur,  
20 pour les cancers de l'ovaire, ne permettent pas d'éviter la chimio-résistance observée ni d'éliminer les récives ou rechutes à long terme.

En conséquence, la Demanderesse s'est donnée pour but de pourvoir à un traitement plus adapté et qui réponde mieux aux besoins de la pratique que les traitements proposés dans l'art antérieur, notamment en ce qu'il évite les récives ou  
25 rechutes à long terme.

La présente invention a pour objet des produits contenant (1) un vecteur d'acide nucléique non viral comprenant au moins une polyéthylène imine (PEI) de poids moléculaire inférieur à 25 kDa, (2) une séquence d'acide nucléique comprenant le gène *bcl-xS* ou un fragment fonctionnel de celui-ci et (3) au moins un  
30 agent anti-tumoral actif sur le cancer de l'ovaire, comme préparation combinée pour une utilisation séquentielle dans le traitement des cancers de l'ovaire, la séquence

d'acide nucléique associée audit vecteur d'acide nucléique non viral étant administrée après le composé anti-tumoral.

Une telle combinaison séquentielle permet, de manière inattendue, de résoudre à la fois le problème de la chimiorésistance et le problème des récidives  
5 ou rechutes à long terme.

Conformément à l'invention :

- le vecteur non viral est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les PEI linéaires de poids moléculaire < 25 kDa, les PEI sur lesquelles sont greffés un sucre ou un peptide, tel que le peptide de liaison aux intégrines  
10 (RGD) ; lesdites PEI sont éventuellement associées à du polyéthylène glycol (PEG) ou de l'acide folique.

Des PEI linéaires utilisables comme vecteur non viral sont notamment décrites dans O. Boussif et al., (PNAS, 1995, 92, 7297-7301), L. Poulain et al., (*Cancer Gene Ther.*, 2000, 7, 4, 644-652), le Brevet américain 6,013,240 au nom de  
15 Rhone-Poulenc Rorer, J.S. Rémy et al., (*Adv. Drug Delivery Rev.*, 1998, 30, 85-95), S. Ferrari et al., (*Gene Ther.*, 1997, 4, 1100-1106), D. Goula et al., (*Gene Ther.*, 1998, 5, 1291-1295), F. Labat-Moleur et al., (*Gene Ther.*, 1996, 3, 1010-1017).

Des thio-dérivés de PEI d'environ 25 kDa, conjugués au peptide de liaison aux intégrines (PEI-RGD) sont décrits dans P. Erbacher et al., (*Gene Ther.*,  
20 1999, 6, 138-145) ; des PEI galactosylées sont décrites dans M.A. Zanta et al., (*Bioconjugate Chem.*, 1997, 8, 839-844) ; et le couplage de ligands membranaires aux PEI est décrit dans R. Kircheis et al., (*Gene Ther.*, 1997, 4, 409-418)

- l'agent anti-tumoral actif sur le cancer de l'ovaire est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les dérivés du platine, les taxanes, les inhibi-  
25 teurs des topoisomérases 1 et 2 et les associations de ces différents produits ; lesdits agents anti-tumoraux sont éventuellement associés à d'autres agents anti-cancéreux et/ou à de l'amphotéricine B ou des dérivés de la caféine.

Le plasmide Bcl-xS combiné avec l'agent antitumoral augmente de manière significative la mort des cellules cancéreuses de telle sorte que les rechutes ou  
30 récidives sont significativement diminuées.

Lesdits produits sont avantageusement combinés dans le cadre d'une utilisation séquentielle dans le traitement des cancers de l'ovaire.

En effet, l'ordre d'administration des produits est essentiel : la séquence nucléique vectorisée doit impérativement être administrée après le composé antitumoral.

La combinaison d'une séquence d'acide nucléique vectorisée (Bcl-xS associée à une PEI, telle que définie ci-dessus) et d'au moins un agent anti-tumoral, administrés dans l'ordre indiqué, présente les avantages suivants :

- potentialisation de l'activité de l'agent antitumoral, ce qui permet de diminuer les doses de l'agent antitumoral
- élimination de l'effet de chimiorésistance à l'agent antitumoral et rétablissement d'un niveau de sensibilité des cellules à l'agent antitumoral, tout à fait satisfaisant et
- élimination des récurrences ou rechutes à long terme.

De manière plus précise, la combinaison séquentielle agent antitumoral et notamment cisplatine puis gène *bcl-xS* vectorisé par un vecteur non viral à base de PEI de poids moléculaire inférieur ou égal à 25 kDa, permet de détruire un nombre suffisant de cellules tumorales par apoptose, pour éviter les récurrences, ce que l'on ne peut obtenir avec le gène Bcl-xS seul, ni avec l'agent antitumoral seul.

Les complexes PEI/ADN seront préférentiellement administrés par voie intra-péritonéale, bien que la voie intraveineuse reste possible. Les complexes sont préparés de préférence dans une solution de glucose 5 % en utilisant un rapport N/P de 5 comme détaillé dans Poulain et al., *Cancer Gene Ther.*; 2000, 7, 4, 644-652. Trois injections à 12 heures d'intervalle sont préférentiellement envisagées.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1A illustre les modifications, induites par une exposition à 5 µg/ml de CDDP, du cycle cellulaire des lignées cellulaires tumorales ovariennes sensibles IGROV1 et OAW42.
- la figure 1B illustre le temps de récupération d'un état de prolifération normal des lignées cellulaires tumorales ovariennes sensibles IGROV1 et OAW42, après une exposition à 5 µg/ml de CDDP.

- la figure 2 est un histogramme présentant l'évolution de la réponse de la lignée cellulaire sensible IGROV1 dans le temps, après une exposition à 5 µg/ml de CDDP.

5 - la figure 3A illustre les modifications, induites par une exposition à 5 µg/ml de CDDP, du cycle cellulaire des lignées cellulaires résistantes IGROV1-R10 et SKOV3.

- la figure 3B illustre le temps de récupération d'un état de prolifération normal des lignées cellulaires IGROV1 et OAW42, IGROV1-R10 et SKOV3, après une exposition à 5 µg/ml de CDDP.

10 - la figure 4 illustre l'évolution de la réponse de la lignée cellulaire résistante SKOV3 dans le temps, après une exposition à 5 µg/ml de CDDP.

- la figure 5 illustre les modifications, induites par une exposition à 20 µg/ml de CDDP, du cycle cellulaire des lignées cellulaires sensibles IGROV1 et OAW42 (A) et des lignées cellulaires résistantes IGROV1-R10 et SKOV3 (B).

15 - la figure 6A illustre l'expression basale de bcl-xL et bcl-xS dans les lignées cellulaires IGROV1 (OV1) et OAW42 (OA) et les lignées cellulaires IGROV1-R10 (OVR) et SKOV3 (SK).

- la figure 6B illustre la présence des protéines Bcl-xL et Bcl-xS dans les lignées cellulaires IGROV1 (OV1) et OAW42 (OA) et les lignées cellulaires  
20 IGROV1-R10 (OVR) et SKOV3 (SK) évaluée par Western blot.

- la figure 7A illustre l'expression de bcl-xL et bcl-xS dans le cytoplasme de cellules tumorales ovariennes mise en évidence par immunohistochimie.

- la figure 7B illustre l'expression des protéines Bcl-xL et Bcl-xS dans des échantillons de tumeurs ovariennes, évaluées par Western blot.

25 - la figure 8A illustre les modifications de l'expression de bcl-x dans les lignées cellulaires IGROV1, OAW42 et IGROV1-R10 et SKOV3, 6h après une exposition à 5 et 20 µg/ml de CDDP.

- la figure 8B illustre les modifications du taux des protéines Bcl-xL et Bcl-xS dans les lignées cellulaires IGROV1, OAW42 et IGROV1-R10 et SKOV3,  
30 24h après une exposition à 5, 20 et 100 µg/ml de CDDP.

- les figures 9 et 10 illustrent l'efficacité d'un protocole combinatoire alliant chimiothérapie (avec différentes concentrations de CDDP) puis transfert

non viral de gène bcl-x pour surmonter la chimiorésistance des cancers de l'ovaire ; ces figures illustrent le nombre de cellules viables (ordonnées) après transfection des cellules SKOV3 avec un plasmide Bcl-xS, 24 h après exposition au CDDP 5 µg/ml.

- la figure 11A illustre les résultats obtenus avec un protocole combinatoire dans lequel des cellules SKOV3 sont transfectées par bcl-xS puis exposée à 5 µg/ml de CDDP, pendant 2 h.

- la figure 11B illustre l'efficacité d'un protocole combinatoire dans lequel des cellules SKOV3 sont exposées à 5 µg/ml de CDDP pendant 2 h, puis transfectées par bcl-xS.

- la figure 12 illustre les résultats obtenus avec un protocole dans lequel le transfert de gène précède de 24 h l'exposition au cisplatine (un effet protecteur peut être observé après exposition à 5 µg/ml de CDDP seul). Dans ce cas, la transfection de Bcl-xS n'augmente pas la cytotoxicité du CDDP et protège même les cellules vis-à-vis de cet agent. Ces résultats montrent bien l'importance de l'ordre d'administration des produits.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

### **Exemple 1: Matériels et méthodes**

#### **Lignées cellulaires**

Les lignées IGROV1 (Bénard et al., *Cancer Res.*, 1985, **45**, 4970-4979), OAW42 (Wilson et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, **72**, 513-521) et SKOV3 (Fogh et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, **59**, 221-226) sont des lignées établies à partir d'adénocarcinome humain de l'ovaire. La lignée IGROV1-R10, obtenue par traitements successifs de la lignée IGROV1 par des doses croissantes de cisplatine, présente une résistance au cisplatine 10 fois supérieure à celle de la lignée parentale (Poulain et al., *Int. J. Cancer*, 1998, **78**, 454-463), comme le démontrent les résultats du test XTT.

Les lignées IGROV1 et SKOV3 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO-BRL) contenant 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO-BRL), 2 mM de L-glutamine (GIBCO-BRL), 33 mM de bicarbonate de sodium et 20 mM d'Hepes. La lignée OAW42 est cultivée dans du milieu DMEM (GIBCO-BRL) contenant 10 % de

sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine (GIBCO-BRL), 1 mM de pyruvate de sodium et 20 UI/l d'insuline bovine (GIBCO-BRL).

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide, en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> et divisées deux fois par semaine par trypsination.

5 Les cellules IGROV1, d'aspect polygonal (caractéristique des cellules épithéliales), poussent en monocouche et sont capables, une fois la confluence atteinte, de former des dômes libérés dans le milieu et de réadhérer sur un nouveau support. Ces cellules sont tumorigènes chez la souris nude. La courbe de croissance de la lignée IGROV1 présente une phase de latence suivie d'une phase exponentielle  
10 avant d'atteindre un plateau après 6 jours de culture. En début de phase exponentielle la population de cellules en suspension représente 1/5 de la population totale alors qu'à la fin de cette phase elle représente 1/10 de la population totale. Le temps de doublement des cellules est de 27h.

Les cellules OAW42 (Wilson et al., 1984, précité) présentent un  
15 aspect similaire à celui des cellules IGROV1, bien que de plus grande taille, mais ne présentent pas les mêmes caractéristiques de croissance. En effet, leur temps de doublement est de l'ordre de 40h, et la confluence provoque un arrêt de croissance et une dégénérescence progressive de la culture en absence de repiquage.

La lignée SKOV3 est issue d'un adénocarcinome ovarien humain  
20 (Fogh et al., 1977, précité). Ces cellules, qui ne poussent qu'en monocouche et supportent difficilement la confluence, présentent un aspect fibroblastique. Leur courbe de croissance montre qu'elles ont un temps de doublement de 26 h.

#### **Traitement avec le cisplatine**

Le cisplatine [cis-diamino-dichloro-platine II (CDDP)] fourni par  
25 Roger-Bellon (Cisplatyl™) est dilué à 1 mg/ml dans de l'eau distillée stérile et conservé à - 20°C. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont traitées pendant 2 heures à 37°C avec différentes concentrations de CDDP dans du milieu sans sérum. Après traitement, les cellules sont rincées et incubées dans du milieu de culture.

#### **30 Test au XTT**

Les cellules sontensemencées sur une plaque à 96 puits (10<sup>4</sup> cellules/puits) puis 2 jours plus tard, pendant la phase exponentielle de croissance, les

cellules sont traitées avec des doses croissantes de CDDP. La cytotoxicité du cisplatine est mesurée par le test de coloration au XTT-PMS, qui mesure la viabilité cellulaire, 6 jours après l'exposition au CDDP, en utilisant le protocole décrit par Scudiero et al., *Cancer Res.*, 1988, **48**, 4827-4833.

5

### RT-PCR

1 µg d'ARN total, extrait à l'aide du kit RNAeasy (QIAGEN) sont rétro-transcrits en ADNc, en présence de 200 UI de transcriptase inverse (Superscript II, GIBCO-BRL), en suivant les instructions du fabricant. L'ADNc obtenu est amplifié à l'aide des amorces 5'-CGCAGAAGGGGTCCTGGTGA-3' et 5'-  
10 CAGCTCCTTCTTCTGCTCCGGGGT-3', comme décrit dans Maronne et al. précité. La réaction de PCR est réalisée en présence de 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM dNTP, 10 pmoles de chacune des amorces et 5 UI de Taq polymérase (EUROBIO) dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 40 sec, hybridation à 58°C pendant 60 sec et extension à 72°C pendant 40 sec (30 cycles), à l'aide d'un thermocycleur  
15 Amplitron<sup>R</sup> (BIOBLOCK). Après électrophorèse des produits obtenus en gel d'agarose à 2 %, deux fragments distincts, correspondant respectivement à Bcl-xS et Bcl-xL sont observés. Le fragment correspondant à la forme longue est beaucoup plus abondant que celui correspondant à la forme courte.

### Immunoblotting

20

Après 6 heures de traitement avec le CDDP, les cellules ou les broyats de tumeurs congelées sont lysés pendant 30 min sur de la glace, dans un tampon contenant 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 % Triton X-100, 4 mM PMSF, 2 mM aprotinine et 5 mM EDTA. Les lysats sont clarifiés par centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à 4°C et la concentration en protéine est mesurée par le test  
25 de Bradford (BIO-RAD). Une fraction d'extrait cellulaire (100 µg de protéines) est séparée par électrophorèse en gel de 10% polyacrylamide-SDS, transférée sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert, 30 minutes à 500 mA dans du Tris-glycine-méthanol (Hybond, AMERSHAM). La membrane est incubée toute la nuit à 4°C dans un tampon T-TBS (132 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6 et 0,1 % Tween  
30 20) contenant 5 % de poudre de lait écrémé. La membrane est incubée, 1 h à température ambiante, avec l'anticorps primaire (anti-Bcl-x, L/S 651186 E, PHARMINGEN) dilué au 1/1000 dans le tampon T-TBS contenant 5 % de poudre de

lait écrémé. Après 3 lavages avec le tampon T-TBS, la membrane est incubée, 1 h à température ambiante, avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (anticorps NA 934, AMERSHAM) dilué au 1/5000 dans le même tampon que l'anticorps primaire. Après, 4 lavages avec le tampon T-TBS et un lavage à l'eau, l'immuno-  
5 réaction est révélée par chimioluminescence (kit ECL, AMERSHAM). Des marqueurs colorés de faible poids moléculaire (BIORAD) servent de référence.

### **Immunohistochimie**

Une fois les coupes de 4  $\mu\text{m}$  réalisées dans les blocs de paraffine, elles sont étalées sur lames polysilanisées de façon à favoriser l'adhérence du tissu sur  
10 la lame lors des différentes étapes qui suivent. Les lames peuvent être stockées entre deux papiers cartonnés à l'abri de l'air et de la lumière jusqu'à utilisation. Les lames sont ensuite déparaffinées par passages successifs de 5 minutes dans 3 bains de toluène, puis dans des bains d'alcool à 100° (x2), 95°, 70° et 50°.

Elles sont ensuite incubées dans un bain de TBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 % durant  
15 10 min, avant de subir 3 passages de 4'15'' au micro-onde 750W dans du tampon citrate 10 mM pH 6.

Après blocage de l'activité peroxydase endogène par incubation dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1 % dans du PBS, les coupes sont transférées dans du tampon PBS. Après une pré-incubation de 20 min dans du tampon TBS  
20 contenant 20 % de sérum de chèvre, les lames sont incubées, 1 h à température ambiante, avec l'anticorps primaire anti-Bcl-x (anticorps S18, SANTA-CRUZ) dilué au 1/500 dans du tampon PBS contenant 0,5 % de sérum albumine bovine (BSA). Après des lavages extensifs, les complexes immuns sont amplifiés à l'aide du kit HRP duet (DAKO), en suivant les instructions du fabricant. Enfin, l'activité immuno-  
25 peroxydase est révélée par incubation, 5 min à température ambiante, dans une solution de DAB (10 mg/ml, SIGMA) dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les lames sont rapidement contre-colorées à l'hématoxyline.

### **Protocole de transfection du plasmide**

La transfection est effectuée comme décrit dans Poulain et al.,  
30 *Cancer Gene Ther.*, 2000, 7, 4, 644-652.

**Exemple 2 : Efficacité de la chimiothérapie sur des lignées cellulaires tumorales ovariennes (IGROV1, OAW42).**

Les cellules tumorales ovariennes IGROV1 et OAW42 décrites à l'exemple 1 sont exposées 2 h à différentes concentrations de CDDP. Les modifications de leur cycle cellulaire et le temps de récupération d'un état de prolifération normal sont observés.

On constate l'élongation de la phase S et l'accumulation des cellules dans les phases G2-M (figure 1A). Les principales différences concernent l'induction de l'apoptose et la survie à long terme des cellules traitées. Alors que les cellules hautement sensibles (OAW42) sont accumulées en phase S et entrent massivement en apoptose dès 48 h après l'exposition à 5  $\mu\text{g/ml}$  de CDDP, les cellules moins sensibles (IGROV1) n'entrent pas en apoptose avant 72 h à 96 h après l'exposition à 5  $\mu\text{g/ml}$  de CDDP. Cependant, dans les deux cas, la quasi-totalité des cellules meurt après 4 jours ; un très faible nombre de cellules sont alors maintenues dans un état quiescent pour plusieurs semaines, avant de récupérer un modèle de croissance normal et la régénération d'une population apte à proliférer.

Le délai avant de récupérer un état de prolifération est de 2 à 4 semaines pour les cellules IGROV1 et est de 8 semaines pour les cellules OAW42 (figure 1B). Après 4 semaines, l'effet de l'exposition à 5  $\mu\text{g/ml}$  de CDDP n'est plus visible sur les histogrammes des cellules IGROV1 (figure 2).

Quand les cellules sensibles sont exposées à 20  $\mu\text{g/ml}$  de CDDP, un fort blocage en phase G0-G1 est observé et les cellules entrent massivement en apoptose après 24 h à 48 h (figure 5A).

Dans cette situation, aucune récurrence n'intervient, la population tumorale ovarienne est totalement éliminée.

**Exemple 3 : Chimiorésistance de lignées cellulaires tumorales ovariennes (SKOV3, IGROV1-R10)**

Les cellules tumorales ovariennes SKOV3 et IGROV1-R10 décrites à l'exemple sont exposées 2 h à différentes concentrations de CDDP. Les modifications de leur cycle cellulaire et le temps de récupération d'un état de prolifération normal sont observés.

On constate un ralentissement de la progression du cycle cellulaire, l'accumulation des cellules en phase G2-M et l'induction de l'apoptose (figure 3A). Chaque événement semble intervenir d'une façon très accélérée en comparaison des cellules sensibles. Ainsi, malgré une mort cellulaire massive, le délai avant la réappa-  
5 rition de cellules aptes à proliférer est quasi éliminé, et la réapparition intervient entre environ 5 et 7 jours pour les cellules SKOV3, et entre 8 et 12 jours pour les cellules IGROV1-R10 (figure 3B).

Après ce temps, les histogrammes ne présentent plus de trace d'exposition à 5 µg/ml de CDDP (figure 4).

10 Quand les cellules tumorales ovariennes résistantes sont exposées à 20 µg/ml de CDDP, elles sont capables de progresser dans le cycle cellulaire (figure 5B). Les cellules IGROV1-R10 s'accumulent en phase G2-M, ce qui n'est pas le cas des cellules SKOV3.

La plupart des cellules subissent alors une apoptose après 48 h, mais  
15 une faible population d'entre elles restent capables de ré-engager un nouveau cycle cellulaire et de re-coloniser un flacon de culture en environ 4 à 5 semaines.

**Exemple 4 : Expression basale de *bcl-x* dans les lignées tumorales ovariennes.**

Par RT-PCR, l'ARNm de *bcl-x* a été mis en évidence dans toutes les lignées cellulaires étudiées, mais seulement sous sa forme longue (forme L) (figure  
20 6A). Une analyse par Western blot démontre en effet que 2 à 3 bandes d'environ 30 kDa, correspondant à la protéine Bcl-xL, sont présentes dans toutes les lignées cellulaires étudiées, alors que la protéine Bcl-xS reste indétectable (figure 6B).

Le niveau de la protéine Bcl-xL est assez similaire dans les lignées cellulaires IGROV1, IGROV1-R10 et SKOV3, mais est visiblement inférieur dans la  
25 lignée cellulaire OAW42.

L'expression de Bcl-x a été également évaluée par histochimie sur un panel de 60 spécimens de tumeurs ovariennes. 90% d'entre elles expriment Bcl-x dans le cytoplasme des cellules tumorales (figure 7A). Le Western blot réalisé sur ces échantillons n'a mis en évidence que la forme longue de la protéine, Bcl-xL (figure  
30 7B).

**Exemple 5 : Modifications de l'expression de *bcl-x* après une exposition au cisplatine des différentes lignées cellulaires tumorales ovariennes sensibles et résistantes.**

Les cellules sont exposées 2 h à différentes concentrations de CDDP  
5 puis les modifications d'expression de l'ARNm de *bcl-x* sont étudiées.

En réponse à une exposition à 20 µg/ml de CDDP, le niveau d'ARNm est diminué dès 6 h après exposition au CDDP dans les lignées cellulaires OAW42 et IGROV1, alors qu'il est maintenu à un niveau élevé dans les lignées cellulaires SKOV3 et IGROV1-R10 (figure 8A).

10 Les mêmes résultats ont été observés au niveau de la protéine 24 h après l'exposition (figure 8B).

En réponse à une exposition à 5 µg/ml de CDDP, le niveau de l'ARNm de *bcl-x* et le niveau de protéine restent stables dans les lignées cellulaires IGROV1, IGROV1-R10 et SKOV3, 6 h et 24 h, respectivement, après l'exposition.

15 Dans le cas de la lignée cellulaire OAW42, le niveau d'ARNm reste stable 6 h après exposition mais le niveau de protéine est largement réduit 24 h après exposition.

**Exemple 6 : Niveau d'expression de Bcl-x et sensibilité au CDDP.**

Le niveau d'expression de la protéine Bcl-x est similaire dans les cellules IGROV1, IGROV1-R10 et SKOV3, mais sensiblement inférieur dans les  
20 cellules OAW42, ces dernières étant également les plus sensibles au CDDP (cf exemple 1, figure 5A).

Aussi, ont été étudiées les modifications d'expression de Bcl-x, en réponse au CDDP dans les différentes lignées cellulaires tumorales ovariennes.

Le CDDP est capable d'induire une répression de l'expression de  
25 Bcl-x dans les lignées cellulaires sensibles (IGROV1, OAW42) mais pas dans les lignées cellulaires résistantes (IGROV1-R10, SKOV3). Néanmoins cette répression peut être observée seulement dans des conditions où une apoptose massive et précoce est observée : IGROV1 exposées à 20 µg/ml de CDDP et OAW42 exposée à 5 ou 20 µg/ml de CDDP et dans lesquelles aucune récurrence n'est observable.

30 La corrélation entre les variations de l'ARN de *bcl-x* et le niveau de protéine après une exposition au CDDP suggère que le niveau de protéine est principalement contrôlé au niveau de l'ARN.

**Exemple 7 : Efficacité *in vitro* de la combinaison d'un agent antitumoral (CDDP) et du transfert non viral d'un gène impliqué dans l'induction de l'apoptose (*bcl-x*) pour surmonter la chimiorésistance des cancers de l'ovaire.**

**A. Exposition à l'agent antitumoral après transfection (figure**

5 **11A).**

Dans ce sens, le protocole combinatoire n'est pas efficace.

**B. Transfection après exposition à l'agent antitumoral.**

Des cellules tumorales ovariennes SKOV3 (figures 9, 10 et 11B), résistantes au CDDP, sont exposées 2 heures à différentes concentrations de CDDP. Environ 24 h après cette exposition, les cellules sont transfectées par le vecteur non viral PEI (22kDa) porteur du gène *bcl-xS*. La viabilité des cellules exposées à ce protocole combinatoire est alors observée au cours du temps par comparaison avec des cellules n'ayant subi aucun traitement, des cellules exposées au CDDP ou des cellules transfectées. Les résultats sont présentés dans les figures 9 et 10 ci-dessous.

15 Les cellules exposées à 5 µg/ml de CDDP ou transfectées ont une viabilité réduite par rapport au témoin 72 h après le début du traitement mais récupèrent progressivement un état de prolifération normal entre 72 h et 168 h.

Les cellules subissant le protocole combinatoire présentent une viabilité largement réduite 72 h après l'exposition à 5 µg/ml de CDDP par rapport aux autres cellules exposées au CDDP seul ou seulement transfectées ; cette viabilité réduite persiste jusqu'à 168 h.

Les cellules exposées à 20 µg/ml de CDDP ou transfectées par *bcl-x* après une exposition à 20 µg/ml de CDDP ont une viabilité largement réduite 72 h après le traitement et cet effet persiste jusqu'à 168 h après le traitement.

25 Cependant, le protocole combinatoire permet d'anéantir totalement la population et, contrairement à la seule exposition à 20 µg/ml de CDDP, aucune récurrence n'est possible, les cellules étant dans un état incapable d'évoluer vers la prolifération.

30 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les

variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

**REVENDICATIONS**

1°) Produits contenant (1) un vecteur d'acide nucléique non viral comprenant au moins une polyéthylène imine (PEI) de poids moléculaire inférieur à 25 kDa, (2) une séquence d'acide nucléique comprenant le gène *bcl-xS* ou un fragment  
5 fonctionnel de celui-ci et (3) au moins un agent anti-tumoral actif sur le cancer de l'ovaire, comme préparation combinée pour une utilisation séquentielle dans le traitement des cancers de l'ovaire, la séquence d'acide nucléique associée audit vecteur d'acide nucléique non viral étant administrée après le composé anti-tumoral.

2°) Produits selon la revendication 1, caractérisés en ce que le  
10 vecteur non viral est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les PEI linéaire < 25 kDa, les PEI sur lesquelles sont greffés un sucre ou un peptide.

3°) Produits selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites PEI sont associées à du polyéthylène glycol (PEG) ou de l'acide folique.

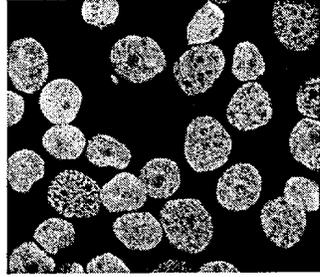
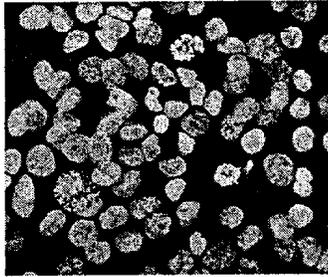
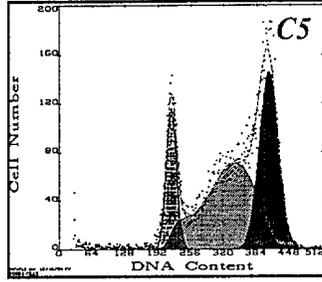
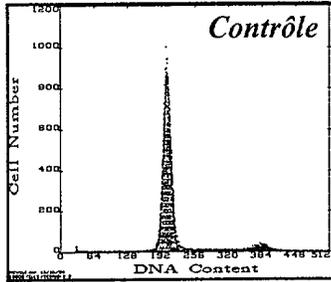
15 4°) Produits selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'agent anti-tumoral actif sur le cancer de l'ovaire est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les dérivés du platine, les taxanes, les inhibiteurs des topoisomérases 1 et 2 et les associations de ces différents produits.

20 5°) Produits selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que lesdits agents anti-tumoraux sont associés à d'autres agents anti-cancéreux et/ou à de l'amphotéricine B ou des dérivés de la caféine.

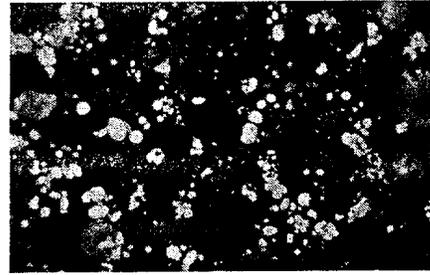
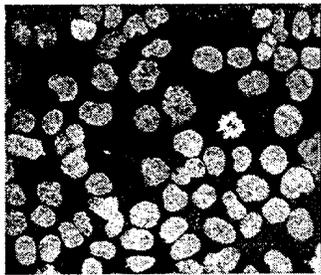
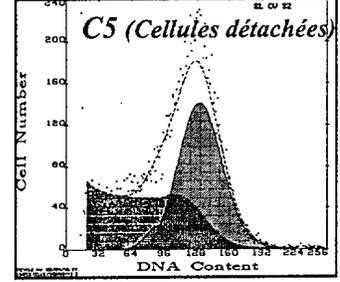
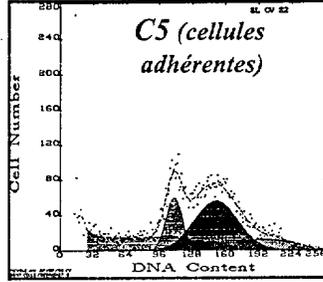
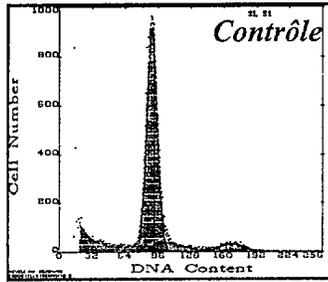
**A**

1/12

**IGROV1**



**OAW42**



**B**

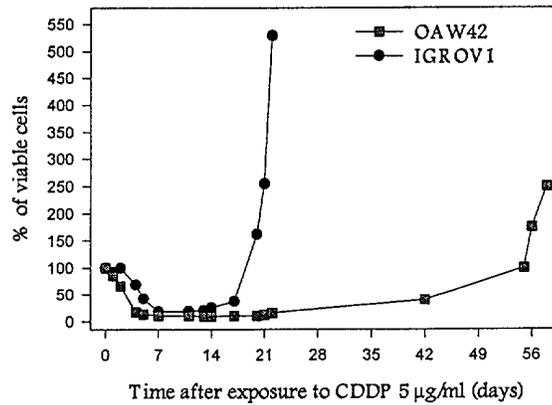
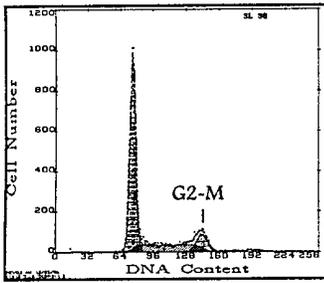
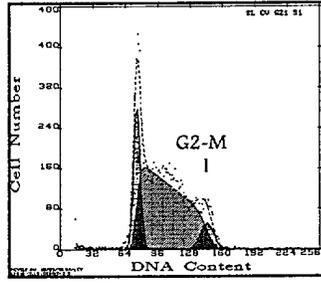


FIGURE 1

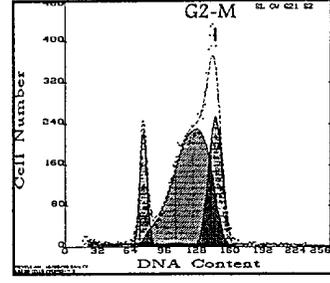
# IGROV1



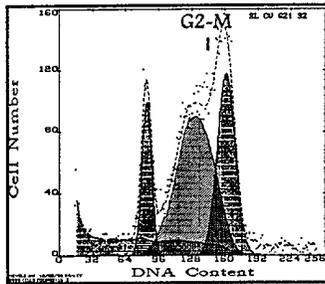
Jour 0



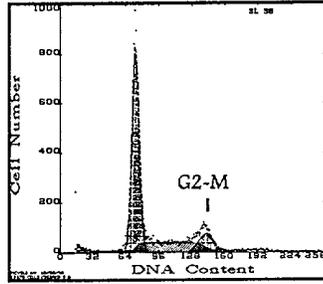
1 Jour



5 Jours



2  
semaines

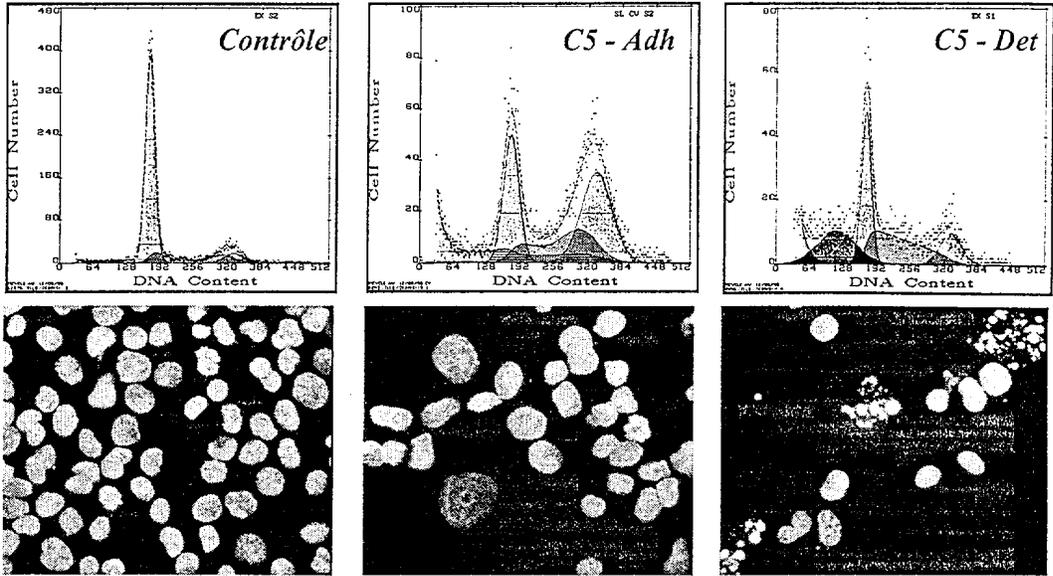


4 semaines

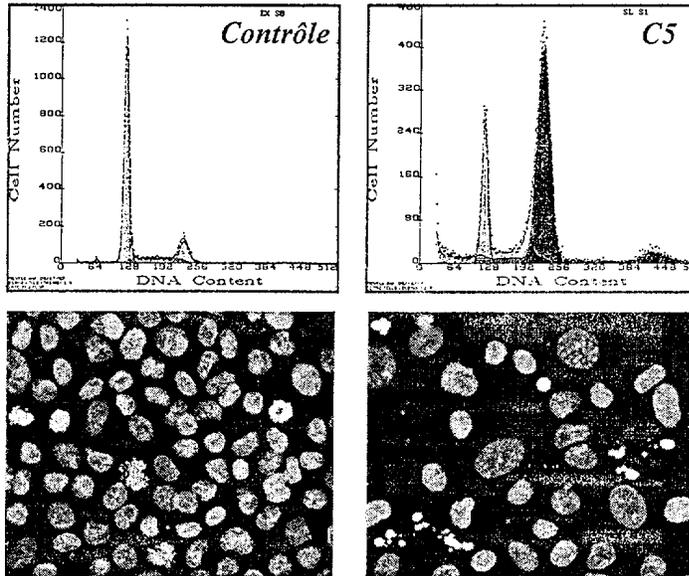
FIGURE 2

**A**

**IGROV-R10**



**SKOV3**



**B**

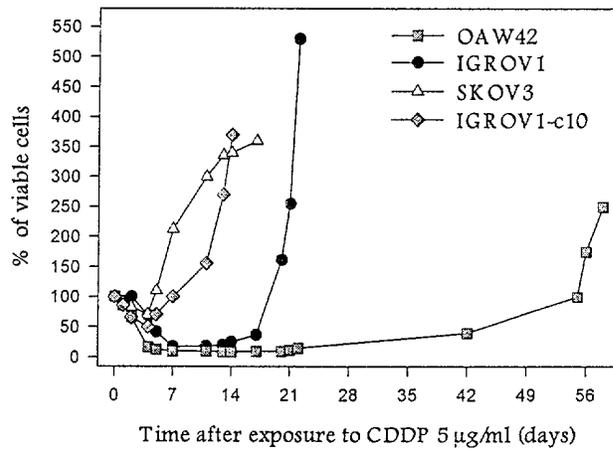


FIGURE 3

# SKOV3

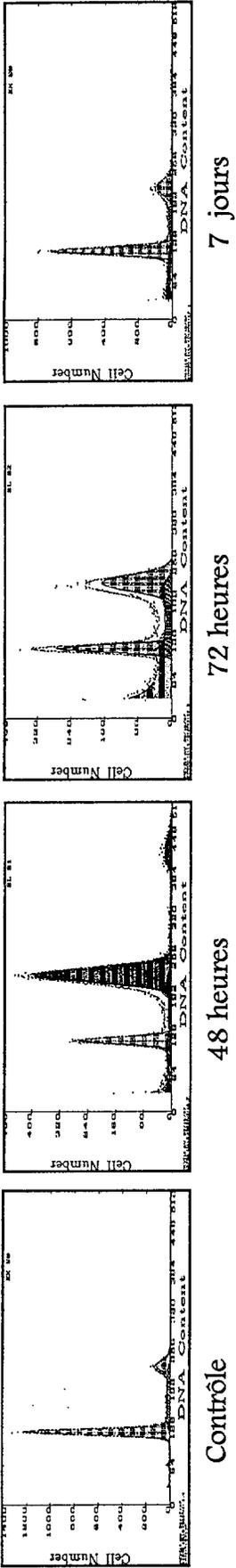


FIGURE 4

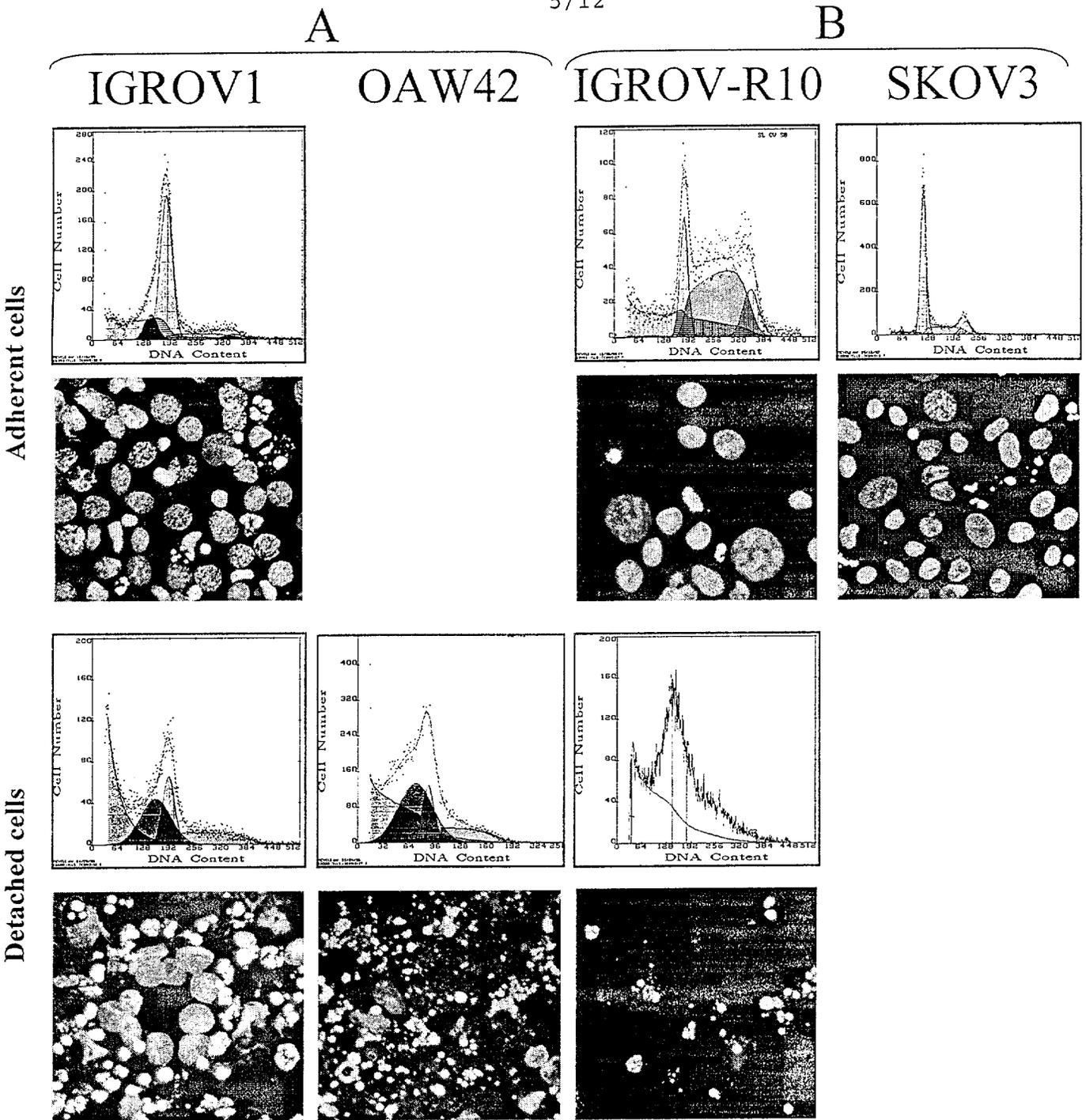


FIGURE 5

6/12

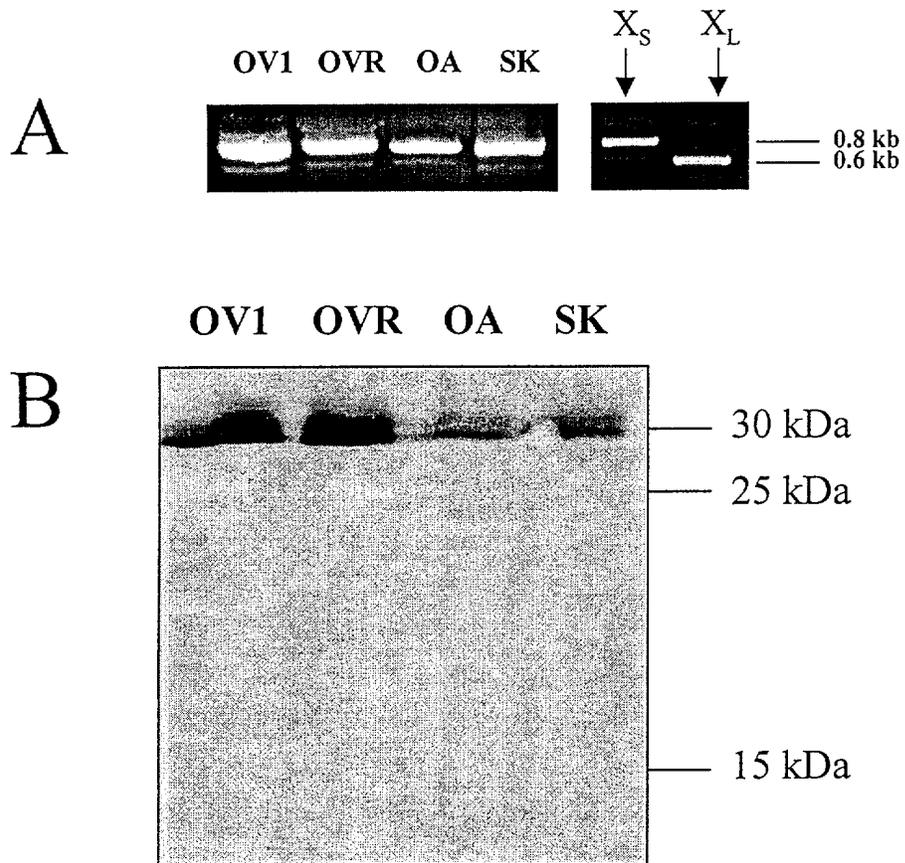
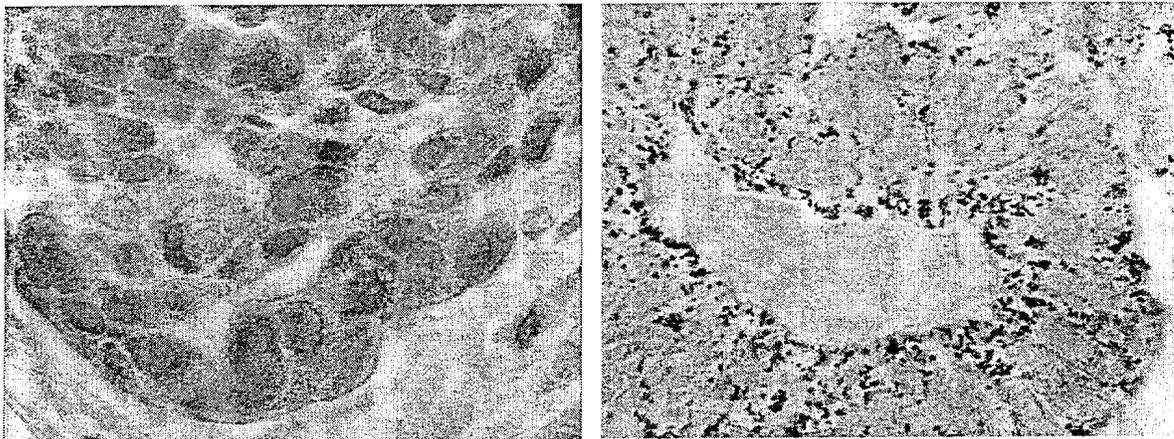


FIGURE 6

7/12

**A**



**B**

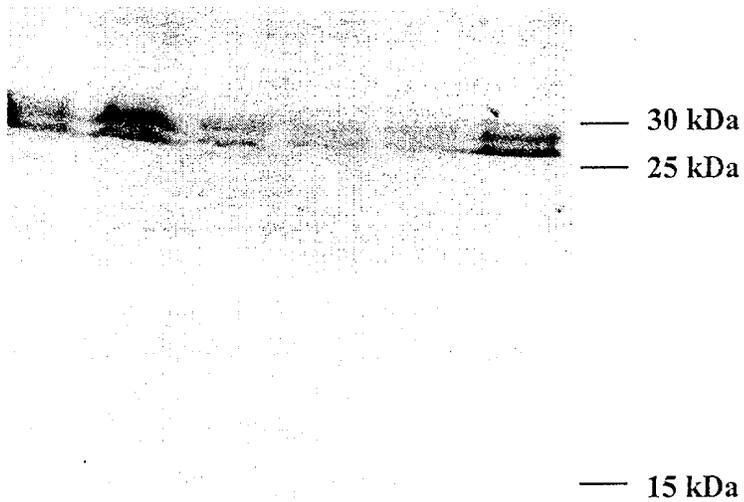


FIGURE 7

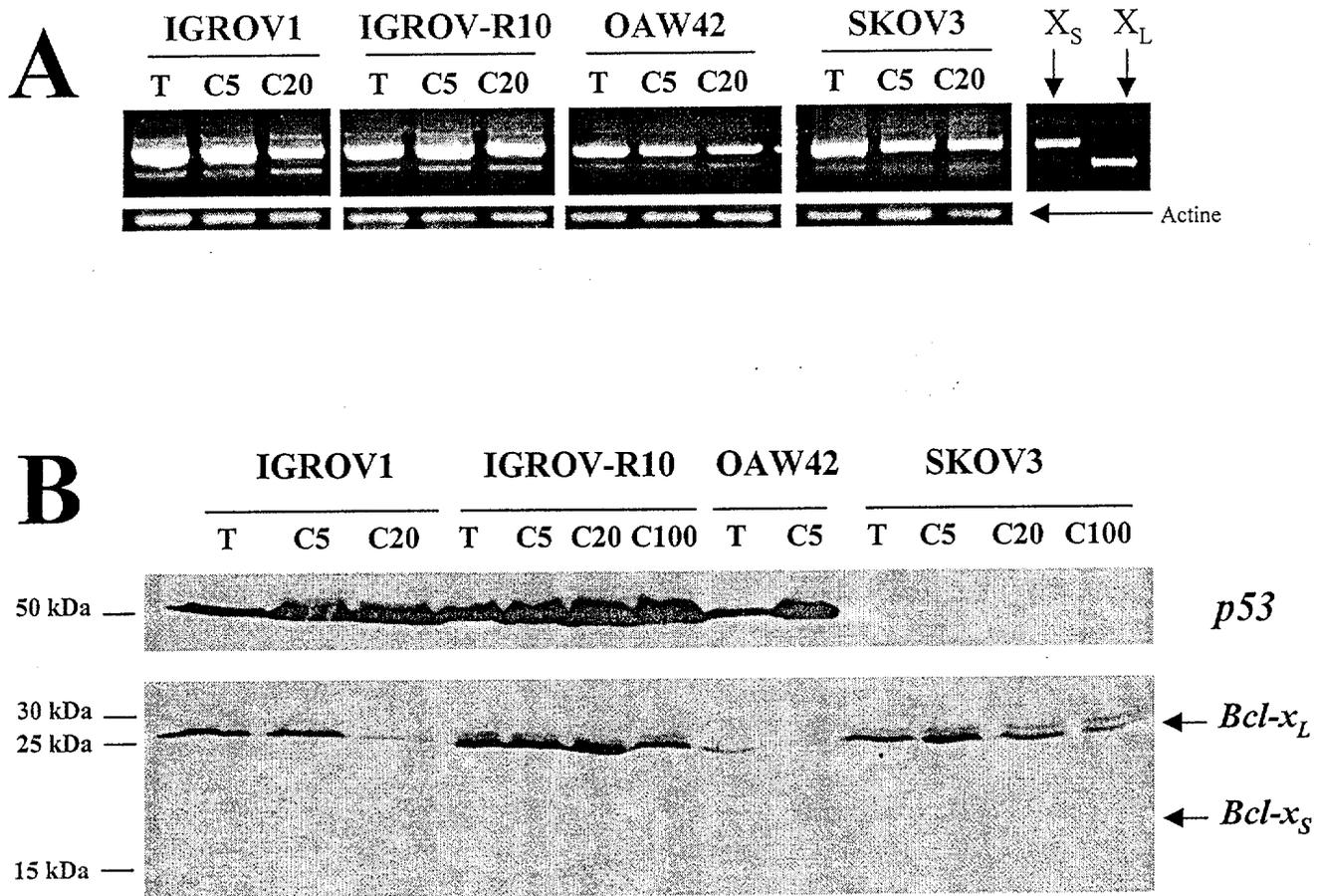


FIGURE 8

9/12

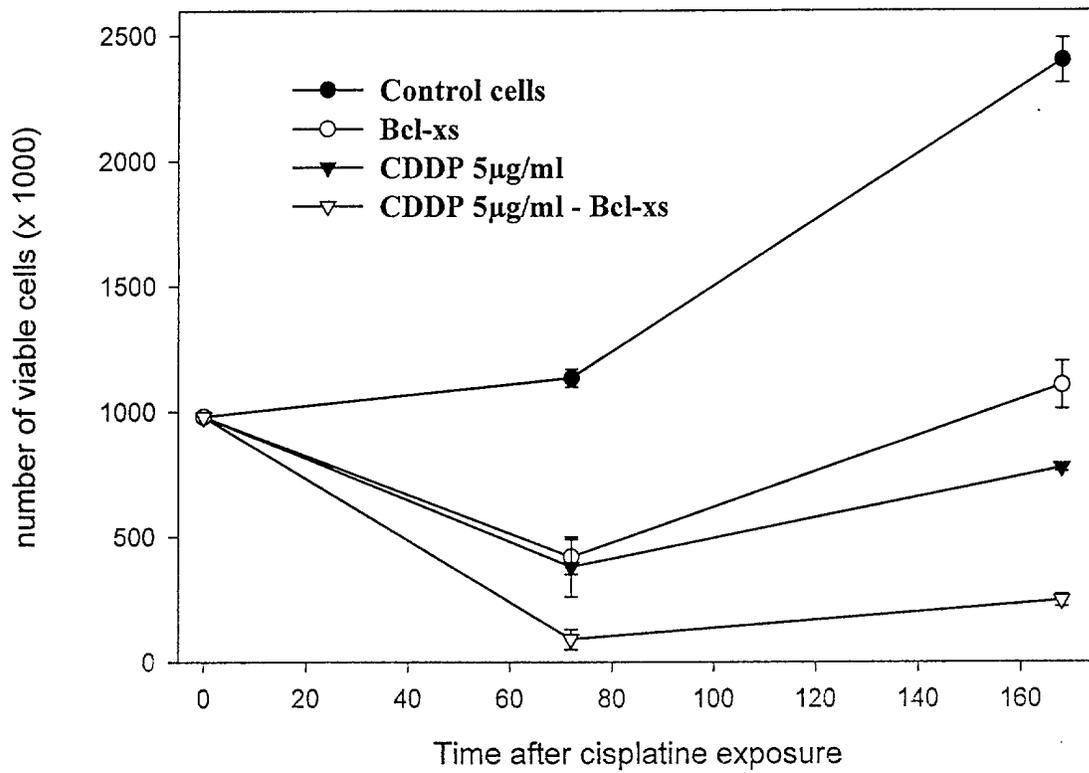


FIGURE 9

10/12

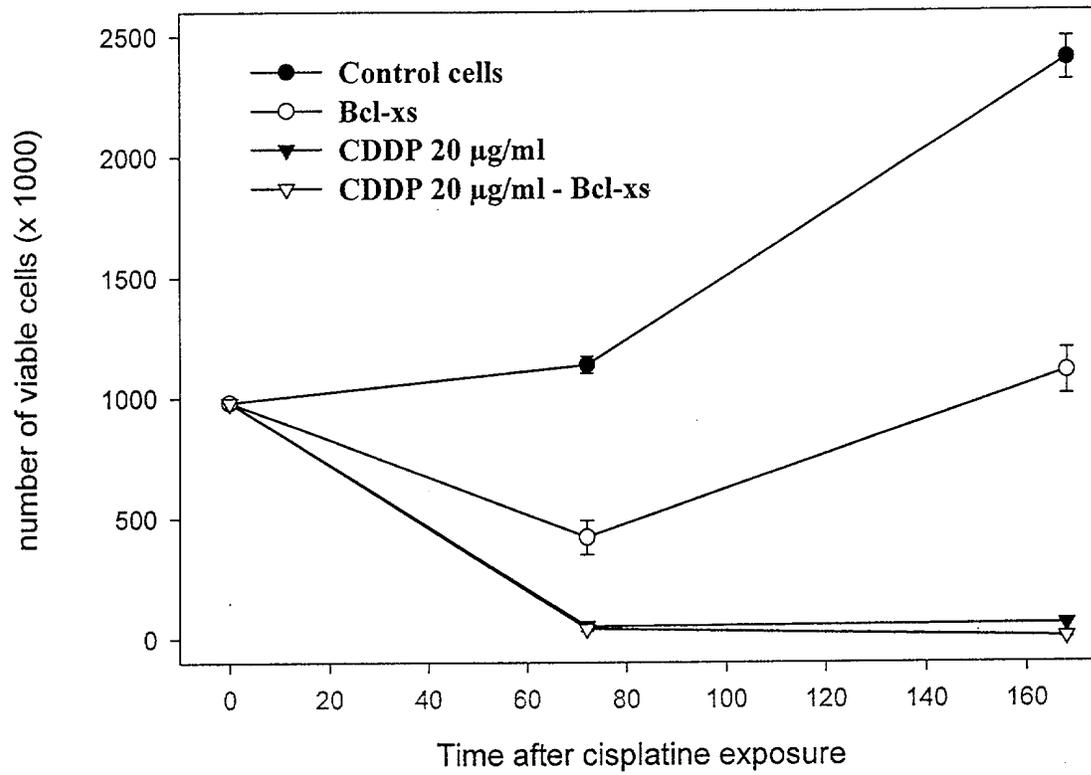


FIGURE 10

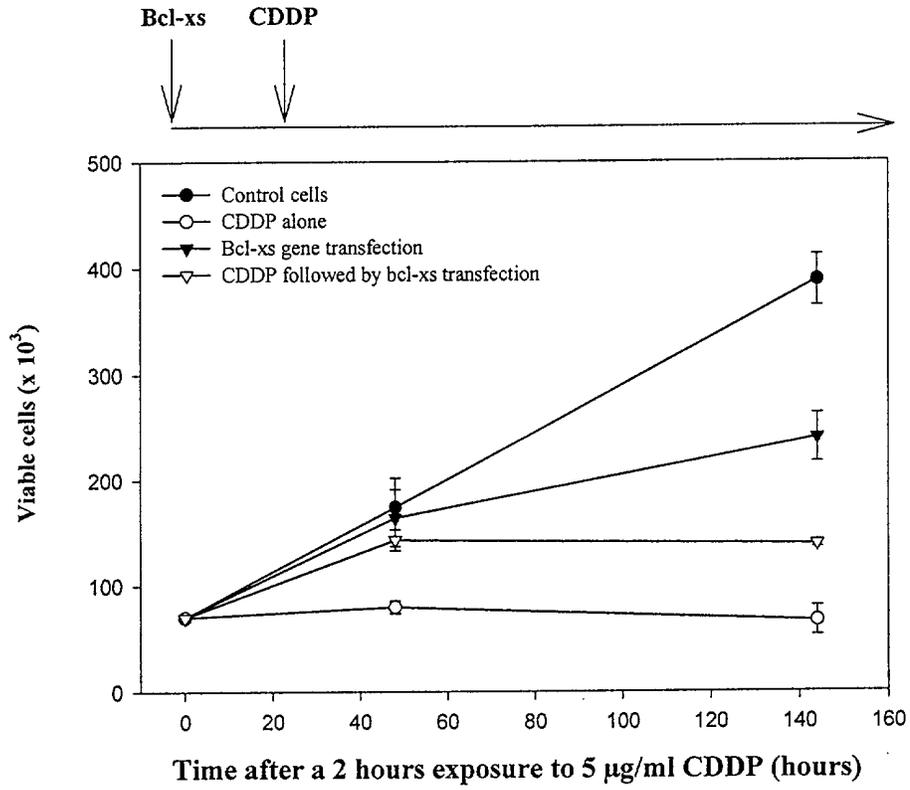


FIGURE 11A

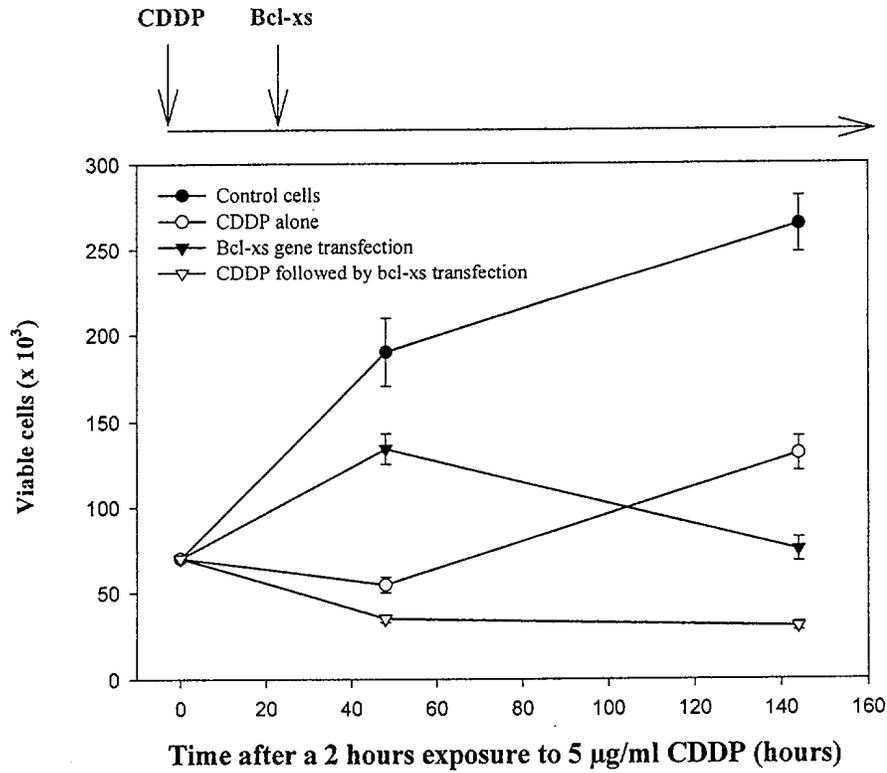


FIGURE 11B

12/12

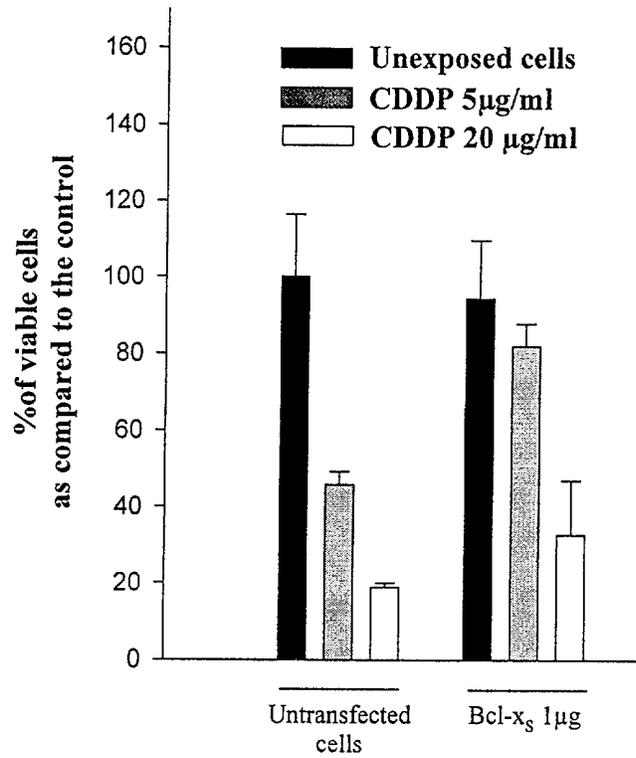


FIGURE 12

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	US 5 834 309 A (NUNEZ GABRIEL ET AL) 10 novembre 1998 (1998-11-10) * revendications *		A61K48/00 A61P35/00
A	RYUNGA KIM ET AL.: "An analysis of the therapeutic efficacy of protracted infusion of low-dose 5-fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer" J. INFECT. CHEMOTHER., vol. 6, 2000, pages 222-228, XP002193938 * tableau 5 *	1-5	
Y	DATABASE MEDLINE 'en ligne! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; WANG H ET AL: "Synergistic Efficacy of Adenovirus-mediated bcl - Xs Gene Therapy and Cisplatin in Ovarian Cancer Cell." retrieved from STN Database accession no. 2002083677 XP002193940 * abrégé * & CHUNG-HUA FU CHAN KO TSA CHIH 'CHINESE JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY!, (2000 FEB) 35 (2) 94-7. ,	1-5	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			A61K
Y	BETTINGER T ET AL: "SIZE REDUCTION OF GALACTOSYLATED PEI/DNA COMPLEXES IMPROVES LECTIN-MEDIATED GENE TRANSFER INTO HEPATOCTES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 10, 1999, pages 558-561, XP000952655 ISSN: 1043-1802 * figure 1 *	1-5	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 mars 2002		Berte, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0108864 FA 606276**

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 22-03-2002  
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
US 5834309 A	10-11-1998	US 5646008 A	08-07-1997
		AU 7177394 A	17-01-1995
		CA 2165969 A1	05-01-1995
		EP 0706568 A1	17-04-1996
		JP 9502603 T	18-03-1997
		WO 9500642 A1	05-01-1995
		US 6303331 B1	16-10-2001

---