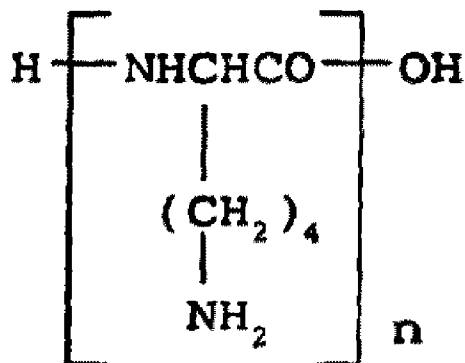




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2015/12/17
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2016/06/23
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2023/09/26
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2017/06/14
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2015/053568
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2016/097618
(30) Priorité/Priority: 2014/12/17 (FR1462595)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61K 47/64* (2017.01),
C07K 1/02 (2006.01), *C07K 1/113* (2006.01)
(72) Inventeur/Inventor:
GEFFARD, MICHEL, FR
(73) Propriétaire/Owner:
HYDRO-FILL TECHNOLOGY, FR
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : UTILISATION DE PLL POUR AMELIORER LA STABILITE DE MOLECULES EN SOLUTION
(54) Title: USE OF PLL FOR IMPROVING THE STABILITY OF MOLECULES IN SOLUTION



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention concerne un complexe moléculaire comprenant :

- au moins un conjugué polylysine (PLL), comprenant :
 - une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F de poids moléculaire moyen compris entre 50 et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ε)-amine de la chaîne carbonée et
 - au moins une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, dans lequel le ou les conjugué(s) et la ou les molécule(s) M sont liés par liaison non covalente. L'invention vise également une composition comprenant un tel complexe, un procédé d'obtention et son utilisation.

ABRÉGÉ DESCRIPTIF

L'invention concerne un complexe moléculaire comprenant :

- au moins un conjugué polylysine (PLL), comprenant :
 - une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F de poids moléculaire moyen compris entre 50 et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et
- au moins une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine,

dans lequel le ou les conjugué(s) et la ou les molécule(s) M sont liés par liaison non covalente.

L'invention vise également une composition comprenant un tel complexe, un procédé d'obtention et son utilisation.

UTILISATION DE PLL POUR AMELIORER LA STABILITE DE MOLECULES EN SOLUTION

La présente invention a pour objet un complexe moléculaire particulier comprenant un conjugué à base de polylysine (PLL) et une molécule instable en solution. Elle vise également une composition comprenant un tel complexe, un procédé d'obtention et son utilisation.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un ou plusieurs conjugués à base de PLL pour
5 améliorer le caractère hydrophile et l'efficacité / l'activité d'une molécule instable en solution sur une période de temps compatible avec l'utilisation de ladite molécule.

La présente invention concerne également un procédé d'identification d'un conjugué ou d'une combinaison de plusieurs conjugués à base de PLL permettant d'améliorer le caractère hydrophile et l'efficacité / l'activité d'une molécule instable en solution ainsi qu'un kit pour sa
10 mise en œuvre.

Un grand nombre de macromolécules d'intérêt général, en particulier dans le domaine pharmaceutique, cosmétique, nutritionnel ou du diagnostic, sont instables en solution, peu solubles ou insolubles. Elles perdent, partiellement ou en totalité, leur activité en solution et deviennent donc difficilement utilisables ou même totalement inutilisables alors qu'elles
15 présentent une activité pharmacologique, cosmétique, nutritionnelle et/ou de diagnostic.

Les raisons d'une telle instabilité en solution sont diverses mais résultent généralement de l'inaptitude de la molécule à conserver un équilibre entre différentes interactions stabilisantes et son entropie structurelle qui tend à déstabiliser l'ensemble.

Cette instabilité a des répercussions importantes en particulier pour l'industriel ayant investi
20 des moyens dans un programme de recherche et développement aboutissant à cette molécule inutilisable, mais également pour les personnes privées de ses effets bénéfiques.

Les solutions techniques qui sont actuellement connues pour pallier ce phénomène d'instabilité, sont souvent très onéreuses, nécessitent un temps de développement considérable et sont aussi peu adaptées à une utilisation thérapeutique, cosmétique,
25 nutritionnelle ou comme réactif de diagnostic de la molécule.

Par exemple, les solutions instables de molécules à visée pharmaceutique sont généralement conservées à des températures avoisinant les -80°C. Elles doivent être réchauffées et

administrées à un patient sous traitement. Ceci présente en outre un inconvénient majeur lié aux dépenses énergétiques nécessaires au maintien d'une température de stabilisation de -80°C, un problème logistique lié à la synchronisation nécessaire entre les étapes de réchauffement de la solution en prenant soin d'éviter la précipitation de la molécule, donc l'incertitude quant à la quantité réelle de molécule active administrée, et la voie d'administration pour les produits pharmaceutiques.

Par ailleurs, des méthodes de stabilisation de macromolécules sont déjà connues telles que la micro-encapsulation, la formation de nanoparticules ou encore la vectorisation, mais ces méthodes ne sont pas non plus satisfaisantes.

La micro-encapsulation est un procédé par lequel un produit, solide, liquide ou pâteux, est incorporé dans des microparticules. Dans le domaine de la santé on utilise les microparticules afin de réaliser un dépôt d'une quantité de médicament qui se libère lentement dans l'organisme. Ce système, bien qu'efficace dans certains cas pour stabiliser et libérer une molécule d'intérêt in-vivo, est incapable de la stabiliser en solution liquide ex-vivo si celle-ci est instable en solution. En outre, les polymères généralement utilisés pour la formation de ces microcapsules sont les dérivés des acides lactique et glycolique (PLGA, PLA), l'éthyl-cellulose, ou la poly-epsilon-caprolactone qui sont biodégradables et susceptibles de laisser des « traces polluantes » pour le receveur et l'environnement.

Les nanoparticules sont utilisées en recherche biomédicale et en médecine. Les nanoparticules sont des particules ultrafines dont une des trois dimensions est inférieure à 100 nm. Cette technologie, outre son coût généralement prohibitif, présente un certain nombre de limitations et d'inconvénients. En effet, la synthèse de ces produits doit être parfaitement reproductible, leurs propriétés physico-chimiques doivent être étudiées en profondeur et avec grande précision, la surface des nanoparticules doit le plus souvent être recouverte de molécules ou polymères permettant d'en augmenter la stabilité colloïdale et la biocompatibilité. Enfin, les mécanismes de dégradation des nanoparticules doivent également être étudiés de manière approfondie, et les risques de toxicité cellulaire, physiologique et histologique doivent être sérieusement évalués. L'utilisation de la nanotechnologie implique donc des risques physiques non négligeables pouvant être à la fois des risques environnementaux et des risques pour la santé des personnes qui les utilisent mais aussi des personnes qui manipulent les nanoparticules pendant leur production. D'autres inconvénients sont liés au fait que l'exposition aux nanoparticules doit être réduite et/ou contrôlée par une

traçabilité qui doit permettre à tout moment de savoir où se trouvent les nanoparticules, dans quel produit, dans quel emballage.

Ainsi, les méthodes connues, bien que permettant dans une certaine proportion de «stabiliser» une macromolécule «in-vivo», c'est-à-dire notamment d'accroître sa biodisponibilité et sa stabilité vis-à-vis de sa dégradation par des enzymes et autres protéines telles que les protéases, les lipases et les glucosidases par exemple, sont incapables de stabiliser une macromolécule «ex-vivo», c'est-à-dire notamment :

- d'une part, de maintenir la macromolécule en solution (sans qu'elle ne précipite) en phase liquide, par exemple pour une solution principalement aqueuse, à une température supérieure à environ 0°C pendant une durée suffisamment longue (pouvant aller jusqu'à plusieurs mois ou années) pour permettre une manipulation aisée de la macromolécule en solution et son stockage en phase solide (sous forme congelée) mais aussi en phase liquide (par exemple à température ambiante),

- et d'autre part, de maintenir également son activité en phase solide et en phase liquide, à une température supérieure à 0°C, pendant toute la durée de son stockage (pouvant aller jusqu'à plusieurs mois ou années).

En général, une macromolécule d'intérêt formulée avec l'une quelconque des méthodes de l'état de la technique n'est stable en solution liquide ex-vivo que pendant très peu de temps, de quelques secondes à quelques minutes, voire quelques heures.

Il existe donc un besoin important en un système alternatif permettant, non seulement de conserver les avantages d'une bonne vectorisation de la macromolécule in-vivo, mais également, la stabilisation de la macromolécule en solution liquide ex-vivo afin d'améliorer son stockage et sa manipulation.

Il existe également un besoin tout aussi important pour un système palliant au moins l'un des inconvénients précités en référence aux systèmes déjà connus, en particulier un système :

- permettant la stabilisation dans une solution d'une molécule instable en solution, de préférence à une température où la solution est en phase liquide et pendant une durée suffisamment longue pour permettre la manipulation et/ou le stockage de la macromolécule,
- permettant le maintien de l'activité, notamment de l'activité biologique, d'une molécule instable en solution même sous forme complexée,

- permettant le maintien de l'activité en solution, notamment de l'activité biologique, d'une molécule instable en solution de préférence à une température où la solution est en phase liquide et pendant une durée suffisamment longue pour permettre la manipulation et/ou le stockage de la macromolécule,
- 5 - ne possédant pas de caractère d'immunogénicité,
- facile à mettre en œuvre,
- peu coûteux à mettre en œuvre,
- permettant de protéger la molécule instable en solution, de l'inactivation chimique, biochimique, enzymatique ou immunologique que la molécule est susceptible de subir,
- 10 - permettant d'améliorer la pharmacocinétique et notamment permettant une libération contrôlée de la molécule instable en solution, et donc de garder sa concentration dans la zone d'efficacité thérapeutique,
- pas ou peu toxique pour l'environnement,
- permettant la réduction des effets secondaires non désirés de la molécule évitant des
- 15 phénomènes de métabolisme, d'élimination ou de toxicité,
- permettant de réduire les effets toxiques, tout en assurant la délivrance d'une quantité suffisante de la molécule dans le site actif,
- permettant une libération sélective et spécifique de la macromolécule, par l'intermédiaire des ligands susceptibles d'interagir avec des cellules cibles,
- 20 - permettant le maintien de l'activité pharmacologique, cosmétique, nutraceutique ou autre de la molécule lorsqu'elle est utilisée.

Pour y répondre la présente invention vise un complexe moléculaire non covalent comprenant au moins un conjugué, préférentiellement un conjugué monofonctionnel, d'une PLL. L'utilisation d'un tel conjugué avec une molécule instable en solution permet d'améliorer la

25 solubilité de la molécule, sa stabilité et de prolonger et/ou maintenir l'activité de la molécule en solution.

Les conjugués de PLL sont connus en particulier pour leur utilisation dans le domaine pharmaceutique. La demande de brevet internationale WO96/15810 notamment, divulgue l'utilisation de ces conjugués pour la préparation de compositions pharmaceutiques utiles

30 dans le traitement de la dégénérescence neuronale, l'autoimmunité, la prolifération cellulaire maligne.

5

Néanmoins ces conjugués n'ont jamais été utilisés pour former des complexes moléculaires via des liaisons non covalentes avec des molécules instables en solution pour améliorer leur stabilité en solution et prolonger ou maintenir leur activité.

C'est l'objet de l'invention qui vise un complexe moléculaire comprenant :

- 5 ○ au moins un conjugué PLL, comprenant :
- une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale,

- 10 ○ au moins une molécule M instable en solution,
le ou les conjugué(s) et la ou les molécule(s) M étant liés / interagissant par liaison non covalente.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention d'un tel complexe, des compositions le contenant et son utilisation.

- 15 L'invention vise aussi l'utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :
- une chaîne principale linéaire de PLL, et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale,

- 20 dans une solution hydrophile, pour améliorer la stabilité en solution d'une molécule M instable en solution, en formant un complexe moléculaire avec cette molécule M par une liaison non covalente. L'invention a aussi pour objet un kit pour la mise en œuvre de cette utilisation.

Enfin, l'invention se rapporte également à un procédé d'identification d'un moins un conjugué

- 25 PLL capable de se lier de façon non covalente à une molécule M donnée instable en solution, ainsi qu'un kit pour la mise en œuvre de ce procédé.

D'une manière générale, l'invention permet de stabiliser en solution une molécule M sous forme d'un complexe moléculaire. En effet, de façon inattendue et surprenante l'invention permet de donner une seconde "vie" à de nombreuses molécules instables en solution, en

- 30 particulier des macromolécules, notamment des macromolécules d'intérêts thérapeutiques, délaissées ou non-utilisées à leur juste valeur, en combinant ladite molécule avec un ou plusieurs conjugué(s) à base de PLL sélectionnée(s) en fonction de la molécule étudiée.

Contre toute attente, il a été montré que les molécules qui étaient instables en solution, généralement en solution à caractère hydrophile et principalement aqueuse, peuvent, grâce à la présence de certains conjugués PLL, être stockées/maintenues en solution liquide, c'est à-dire par exemple à une température supérieure à 0°C pour les solutions principalement aqueuses, et même à température ambiante, pendant plusieurs jours, mois et même
5 probablement années, sans perte notable de leur activité pharmacologique initiale ou de l'une ou l'autre de leurs propriétés.

De manière toute aussi surprenante, les complexes de l'invention ainsi formés et stables ex-vivo, peuvent aussi être directement utilisés in vivo dans des applications thérapeutiques, cosmétiques, nutritionnelles, chirurgicales ou diagnostiques, et notamment être administrés
10 à un patient, sans qu'il n'y ait de problèmes particuliers liés à la toxicité. En ces termes, les complexes de l'invention peuvent également agir en tant que vecteurs thérapeutiques, protégeant in-vivo la molécule M complexée contre les attaques, notamment, des systèmes métaboliques enzymatiques et immunitaires du corps humain ou animal.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre, faite en regard d'exemples non limitatifs et de figures annexées sur lesquelles :

- la figure 1A représente le spectre IRFT obtenu pour le conjugué cystéine-G-PLL selon l'invention ; sur cette figure on peut observer la PLL identifiée par la zone 1700-1550 cm^{-1} et la cystéine représentée par les pics vers 1300 et 700 cm^{-1} ,

- la figure 1B représente le spectre IRFT obtenu pour le conjugué méthionine-G-PLL selon l'invention ; sur cette figure on peut observer la PLL identifiée par la zone 1700-1550 cm^{-1} et la méthionine représentée par les pics vers 1300, 900 et 700 cm^{-1} ,

- la figure 1C représente le spectre IRFT obtenu pour le conjugué glutathion-G-PLL selon l'invention ; sur cette figure on peut observer la PLL identifiée par la zone 1700-1550 cm^{-1} et la glutathion représentée par les pics vers 1300 et 1200 cm^{-1} ,

- la figure 1D représente le spectre IRFT obtenu pour le conjugué taurine-G-PLL selon l'invention ; sur cette figure on peut observer la PLL identifiée par la zone 1700-1550 cm^{-1} et la taurine représentée par les pics vers 1300, 1000 et 700 cm^{-1} ,

- la figure 1E représente le spectre IRFT obtenu pour le conjugué orotyl-PLL selon l'invention. Sur cette figure on peut observer la PLL identifiée par la zone 1700-1550 cm^{-1} et la orotyl représentée par les pics vers 1300 et 800 cm^{-1} ,

- la figure 2 représente la structure protéique du facteur VIII par étude in silico,

- la figure 3 représente la structure protéique de l'hémoglobine par étude in silico,
- la figure 4 représente la structure protéique de l'albumine par étude in silico.

DEFINITIONS

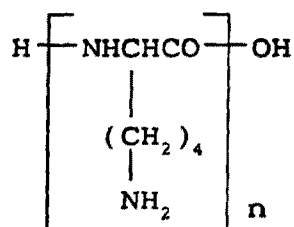
5 Au sens de la présente invention, on entend par «complexe» ou «complexe moléculaire», une entité formée par la mise en contact d'une molécule M instable en solution et d'un ou plusieurs conjugué(s) d'une PLL lié(s) par liaison non covalente.

Au sens de l'invention, on entend par «conjugué PLL», une molécule issue d'un couplage covalent sur une PLL, d'une ou plusieurs molécules F. Par «conjugué monofonctionnel de PLL», on entend le produit de couplage d'une molécule F à la PLL. Par «conjugué polyfonctionnel de
10 PLL», on entend le produit de couplage d'au moins deux molécules F. Par exemple, un conjugué bifonctionnel peut être représenté par la formule : molécule F1 - PLL - molécule F2. Au sens de l'invention, on entend par «molécule F» un substituant ou une molécule non-immunogénique.

On entend par « substituant » une molécule de faible poids moléculaire généralement compris
15 entre environ 50 Daltons et environ 1000 Daltons, de préférence compris entre environ 200 Daltons et environ 600 Daltons, et de préférence encore compris entre environ 150 Daltons et environ 500 Daltons, pouvant être liée par liaison covalente ou interagir par liaison covalente à une PLL en position epsilon (ϵ)-aminé de la chaîne carbonée.

On entend par «immunogénique» toute molécule capable d'induire une réaction immunitaire.
20 Une molécule «non immunogénique» est donc une molécule qui n'induit pas de réaction immunitaire.

Au sens de la présente invention, on entend par «PLL» ou «polylysine» un polypeptide ou homopolymère constitué principalement de L ou D-Lysine linéaire (c'est-à-dire non-ramifiée par une autre ou d'autres lysines) ou principalement de L-lysine linéaire. Elle répond à la
25 formule :



(cf Merck Index, 10ème édition, abrégé N° 7444).

Au sens de l'invention, on entend par « molécule M instable en solution » une molécule instable en solution, préférentiellement une macromolécule. Il peut s'agir notamment d'une protéine, d'un lipide, d'un sucre, d'un acide nucléique ou de toute autre biomolécule de grande taille ; Par « instable en solution » on entend une molécule présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, notamment dans un solvant aqueux. Il peut s'agir de molécules hydrophobes ou peu hydrophiles, ou de molécules hydrophiles mais dont l'activité est diminuée en solution.

Au sens de la présente description, on entend par « liaison non-covalente » toute liaison qui n'est pas covalente, notamment une liaison de type ionique, hydrogène, ou Van Der Waals.

Au sens de l'invention on entend par « activité pharmacologique ou biologique » la conséquence observée que peut avoir l'absorption d'une molécule ou d'une substance par un organisme telle qu'obtenue par une méthode d'analyse permettant la détection d'une telle activité. Celle-ci peut être évaluée, par exemple, en observant et évaluant l'occupation sélective d'un récepteur ou l'interaction spécifique avec une enzyme ou protéine (e.g. l'interaction antigène-anticorps) de la molécule ou substance d'intérêt. Dans le cadre de la présente demande, la diminution ou la perte de l'activité pharmacologique d'une substance ou macromolécule d'intérêt en solution liquide est une indication de l'instabilité de ladite substance en solution liquide.

Au sens de la présente invention, on entend par « activité biologique initiale » ou « activité pharmacologique initiale », l'activité biologique ou pharmaceutique d'un complexe selon l'invention telle que mesurée pour la première fois après sa mise en solution. Le temps écoulé entre la mise en solution du complexe et la première mesure d'activité peut être variable et sujet à l'influence de divers paramètres dont notamment la rapidité d'exécution de la prise de mesure qu'elle soit automatisée ou manuelle. Pour améliorer la reproductibilité de l'expérimentation, on pourra standardiser la prise de la première mesure qui pourra être effectuée, par exemple, environ au moins 3 minutes, de préférence environ 15 minutes, après

la mise en solution du complexe selon l'invention. On entend par «activité biologique d'origine» ou «activité pharmacologique d'origine» l'activité biologique ou pharmacologique d'une molécule avant sa mise en contact (i.e. sa complexation) avec un ou plusieurs conjugués tels que définis dans la présente demande. On entend par «variation de l'activité pharmacologique ou biologique», la valeur absolue de la différence entre la valeur observée et mesurée de l'activité initiale et la valeur observée et mesurée de l'activité à un instant «t» après la mise en solution de la macromolécule. On entend par «maintien de l'activité pharmacologique ou biologique», une variation de l'activité pharmacologique ou biologique telle que définie ci-dessus d'au plus 30%, de préférence d'au plus 20%, de préférence d'au plus 10%, de préférence encore d'au plus 5% ou bien encore d'au plus 1%.

Au sens de la présente invention, on entend par «solvant aqueux» un solvant principalement ou essentiellement aqueux, c'est-à-dire contenant au moins environ 70% d'eau, de préférence au moins environ 80% d'eau et de préférence encore au moins environ 90% d'eau ou bien encore au moins environ 95% d'eau.

Au sens de l'invention, on entend par «solution en phase liquide» ou «solution à l'état liquide» une solution qui n'a pas atteint son point de congélation. A titre d'exemple, une solution aqueuse ou principalement aqueuse conservée à une température inférieure à environ 0°C, de préférence inférieure à environ -5°C, ne peut être considérée comme étant en phase liquide.

DESCRIPTION DETAILLEE

Complexe moléculaire

Selon un premier aspect, l'invention concerne donc un complexe moléculaire comprenant :

- au moins un conjugué PLL, comprenant :
 - une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, et
- au moins une molécule M instable en solution,

le ou les conjugué(s) et la ou les molécule(s) M étant liés par liaison non covalente, c'est-à-dire interagissant par liaison non covalente.

Conjugué PLL

Le conjugué PLL peut être monofonctionnel ou polyfonctionnel. Un même complexe s'il contient plusieurs conjugués PLL, peut contenir uniquement des conjugués monofonctionnels, uniquement des conjugués polyfonctionnels ou un mélange de conjugué(s) monofonctionnel(s) et polyfonctionnel(s). Préférentiellement le conjugué PLL est monofonctionnel.

Il comprend une chaîne linéaire de PLL et au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 et 1000 Daltons. La ou les molécules F sont liée(s) de façon covalente à la chaîne principale. Le conjugué PLL peut être constitué exclusivement d'une chaîne principale linéaire de PLL et d'au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale. La chaîne PLL a un poids moléculaire moyen préférentiellement compris entre 2000 et 300000 Daltons, ce qui signifie que son degré de polymérisation (c'est à dire la valeur de l'indice n de la formule donnée dans la partie définition) est compris entre environ 15 et environ 2360 soit 127 résidus lysyl.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la chaîne PLL présente dans le complexe moléculaire selon l'invention a un poids moléculaire moyen qui est généralement compris entre 2000 et 300000 Daltons, ce qui signifie que son degré de polymérisation est compris entre environ 15 et environ 2360, préférentiellement entre 20000 et 50000 Daltons ce qui signifie un degré de polymérisation de 155 et 394 soit entre 155 et 374 lysines. Encore plus préférentiellement, la chaîne PLL comprend entre 30 et 150 lysines correspondant à un poids moléculaire moyen compris entre 3800 et 19100 Daltons, de préférence encore entre 50 et 100 lysines correspondant à un poids moléculaire moyen pour la chaîne PLL compris entre 6400 et 13000 Daltons.

La chaîne linéaire principale PLL du conjugué est préférentiellement une chaîne linéaire alpha.

La molécule F a préférentiellement un poids moléculaire compris entre 100 Daltons et 1000 Daltons, encore plus préférentiellement entre 200 Daltons et 1000 Daltons, en particulier entre 300 Daltons et 1000 Daltons, encore plus particulièrement entre 400 Daltons et 1000 Daltons, et de préférence entre 500 Daltons et 1000 Daltons.

Les molécules F sont des substituants ou des molécules non-immunogéniques. Des molécules telles que décrites dans la demande de brevet PCT WO96/15810 peuvent notamment être

utilisées pour la présente invention. Les molécules F sont préférentiellement choisies dans l'une des trois catégories suivantes :

- Les molécules à caractère "acide gras ou lipidique", qui comprennent :

* les acides gras mono- ou dicarboxyliques, ci-après communément désignés par le terme (di)acide gras, à chaîne linéaire ou ramifiée, saturés ou insaturés, comprenant généralement de 4 à 24 atomes de carbone ;

* les composés impliqués dans le mécanisme d'ancrage des protéines aux membranes cellulaires, ces composés intervenant notamment dans le cycle du mévalonate, en particulier les isoprénoïdes liés à une cystéine ;

* le cholestérol et ses dérivés, notamment les hormones hydrophobes.

- Les molécules à caractère "anti-oxydant", qui comprennent :

* la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou l'un de leurs dérivés ;

* la cystéine et ses dérivés, de formule : $R1S-R2-CH(NH_2)-COOH$ dans laquelle R1 représente H ou CH_3 et R2 représente un C1-C3 alkylène.

- Les molécules à caractère "acide aminé ou neurotransmetteur", qui comprennent :

* les indolealkylamines ;

* les catécholamines;

* les acides aminés de formule : $R3-CH(NH_2)-COOH$ dans laquelle R3 représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle, un groupe carboxyméthyle ou un groupe aminopropyle ;

* les acides amino(C1-C5)alkylsulfoniques ou sulfiniques;

* la carnitine ou la carnosine;

* les diamines de formule : $2HN-A-NH_2$ dans laquelle A représente un (C1-C6)alkylène ou un groupe $-(CH_2)_m-NH-B-(CH_2)_p-$ dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe $-(CH_2)_n-NH-$, n étant un entier allant de 1 à 5 ;

* l'acétylcholine et

* l'acide γ -aminobutyrique.

On distinguera donc trois sortes de conjugués (qu'ils soient monofonctionnels ou polyfonctionnels) : les conjugués "acide gras ou lipidiques"; les conjugués "anti-oxydants"; et les conjugués "acides aminés ou neurotransmetteurs".

Généralement, le (di)acide gras comprend de 4 à 24 atomes de carbone, comme par exemple l'acide butyrique, maléique, succinique, glutarique, adipique, pimélique, subérique, sébasique, caproïque, caprylique, caprique, laurique, myristique, palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, [gamma]-linolénique, [alpha]-linolénique, arachidique, gadoléique, arachidonique, béhénique, érucique ou azélaïque. De préférence, l'acide est
 5 choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique ou le (di)acide, l'acide azélaïque, par exemple.

Les isoprénoïdes liés à une cystéine comprennent généralement de 6 à 20 atomes de carbone. Préférentiellement, on utilise dans le cadre de l'invention le farnésyl-cystéine, le géranyl-
 10 géranyl-cystéine ou le mévalonate-cystéine.

Comme hormone hydrophobe, on utilise préférentiellement la progestérone ou le 2-méthoxyoestradiol.

Comme dérivé de la cystéine, on utilise préférentiellement l'homocystéine ou la méthionine. Les indolealkyleamines et catécholamines utilisées dans le cadre de l'invention comprennent
 15 notamment le tryptophane, le 5-méthoxytryptophane, la sérotonine, la tryptamine, la 5-méthoxytryptamine, la mélatonine, la phénylalanine, la 3,4- dihydroxyphénylalanine et la tyrosine.

Comme acides aminés, on utilise de préférence l'histidine, la glycine, l'aspartate. Les acides amino(C1-C5)alkylsulfoniques ou sulfiniques utilisés selon l'invention incluent notamment la
 20 taurine, l'homotaurine et l'hypotaurine. Les diamines utilisées de manière préférentielle dans le cadre de l'invention sont la putrescine, la cadavérine, la spermine et la spermidine.

A titre d'exemple non limitatif, on peut citer comme conjugué PLL utilisable pour la mise en œuvre de l'invention l'acide oléique-PLL, l'acide azélaïque-PLL et le 5-méthoxytryptamine-PLL.

De préférence, on utilisera une cystéine-PLL, une méthionine-PLL, une taurine-PLL, une glutathion-PLL ou une acidethiotique-PLL. Ainsi la ou les molécule(s) F liée(s) de façon covalente à la chaîne principale PLL est (sont) choisie(s) parmi la cystéine, la méthionine, la
 25 thiorine, le glutathion et l'acide thiotique.

Selon un mode de réalisation adapté, le rapport massique moléculaire et l'aire des pics entre la ou les molécules F et la chaîne principale (déterminé par IRTF) est compris entre environ 10
 30 et environ 20.

Molécule M instable en solution

La molécule M est préférentiellement une macromolécule, c'est-à-dire une molécule ayant un poids moléculaire de préférence supérieur à 1000, préférentiellement à 2000 Daltons, encore plus préférentiellement supérieur à 5000 Daltons et en particulier supérieure à 10000 Daltons.

- 5 Les molécules M peuvent être organiques et/ou minérales et peuvent être d'origine naturelle et/ou synthétique. Préférentiellement il s'agit de molécules organiques.

De préférence les molécules M sont des molécules utiles dans les systèmes biologiques, de préférence utiles dans les domaines thérapeutiques, cosmétiques, nutritionnels et/ou de diagnostiques. La ou les molécules M sont donc très préférentiellement des molécules
10 présentant une activité pharmacologique et/ou nutritionnelle et/ou cosmétique et/ou est un réactif de diagnostic.

Préférentiellement, elles appartiennent à la famille des glucides, des protéines, des lipides, des protides (aussi dénommés protéines conjuguées) telles que, par exemple, les lipoprotéines, les mucoprotéines, les nucléoprotéines, les acides nucléiques (telles que ADN,
15 ARN, ARN interférents, ARNt, ARNcyst etc..) et les protéines métalliques (exemple : métalloprotéines).

Parmi les molécules M de type glucide, on peut citer les oligosaccharides (sucres composés de 2 à 10 unités de base de monosaccharides), les polysaccharides. Les exemples de molécules M de type oligosaccharide et polysaccharide pouvant être mis en oeuvre dans l'invention sont
20 notamment le collagène, la cellulose, l'amidon, le Facteur VIII, des immunoglobulines.

Parmi les molécules M de type protéine on peut citer notamment, les protéines de structure qui permettent à la cellule de maintenir son organisation dans l'espace ; les protéines de transport qui assurent le transfert des différentes molécules dans et en dehors des cellules ; les protéines régulatrices qui modulent l'activité d'autres protéines ou qui contrôlent
25 l'expression des gènes ; les protéines de signalisation qui captent les signaux extérieurs et assurent leur transmission dans la cellule ou l'organisme telles que, par exemple, les protéines hormonales ; les protéines réceptrices qui détectent les molécules messagères et les autres signaux pour que la cellule agisse en conséquence telles que, par exemple, les protéines sensorielles et les récepteurs d'hormone comme l'insuline ; les protéines motrices qui
30 permettent aux cellules ou organismes ou à certains éléments de se mouvoir ou se déformer telles que l'actine et la myosine ; les protéines de défense qui protègent la cellule contre les virus telle que par exemple, les anticorps ; les protéines de stockage qui permettent la mise

en réserve d'acides aminés pour pouvoir créer d'autres protéines telle que, par exemple, l'ovalbumine et les enzymes. Les exemples de molécules M de type protéine pouvant être mis en œuvre dans l'invention sont les immunoglobulines, les protéines de la coagulation, les facteurs VIII et IX, l'albumine, etc.

- 5 Parmi les molécules M de type lipides, on peut citer les acides gras saturés et insaturés, les glycérides, (mono, di et tri) et les phospholipides. Les exemples de molécules M de type lipide pouvant être mis en œuvre dans l'invention sont les lipoprotéines par exemple la lipoprotéine A.

Préférentiellement la molécule M est une protéine.

- 10 La ou les molécule(s) M et le ou les conjugué(s) PLL sont liés de façon non covalente par au moins une liaison non covalente. Une molécule M et un conjugué PLL peuvent être liés par une ou plusieurs liaisons non covalentes.

Selon un mode de réalisation adapté, le rapport entre la concentration moléculaire du ou des conjugué(s) et celle de la ou des molécule(s) M est compris entre 1 et 30.

15 **Composition**

Selon un autre aspect, l'invention concerne également une composition comprenant un ou plusieurs complexe(s) moléculaire(s) selon l'invention en solution dans un solvant hydrophile, de préférence choisi parmi l'eau, un tampon phosphate, du sérum physiologique ou un mélange de ceux-ci.

- 20 Les solvants hydrophiles utiles pour mettre en œuvre l'invention peuvent être variés dans la mesure où ils permettent la mise en solution de la (ou des) molécule(s) M et du (ou des) conjugué(s) sélectionné(s).

La composition peut comprendre en plus du ou des complexe(s) moléculaire(s) selon l'invention et du solvant hydrophile, au moins un autre composé. Il peut s'agir par exemple

- 25 d'un autre composé pharmaceutiquement compatible choisi parmi un excipient, un tensioactif, un véhicule, etc.

Procédé d'obtention

Synthèse des conjugués PLL

Les méthodes de couplage entre les molécules F et la PLL, pour l'obtention des conjugués PLL

- 30 selon l'invention sont les méthodes de couplage chimique classiques bien connues de l'homme du métier, entre un groupe fonctionnel de chaque molécule et le groupe fonctionnel ϵ -amine de la PLL. Ces couplages sont réalisés par l'intermédiaire d'un agent de couplage,

choisi par exemple parmi le glutaraldéhyde, l'anhydride succinique ou glutarique, les carbodiimides, le chloroformiate d'éthyle ou l'hexaméthylène diisocyanate. Des exemples de telles méthodes de couplage sont notamment celles décrites dans *Geffard et al., C.R. Acad. Sci. Paris : 295, 797-802, (1982)*. On peut également associer les molécules à la PLL par simple

5 adsorption. Des exemples de méthodes de couplage appropriées sont décrites en détail dans les préparations ci-après.

A titre illustratif, le couplage entre lesdites molécules et la PLL peut être effectué entre la fonction ϵ -amine de la PLL et une fonction carboxylique desdites molécules ou autres fonctions chimiques activables.

10 Ainsi, dans le cas des acides gras, notamment l'acide myristique, l'acide palmitique, etc., ainsi que dans le cas des isoprénoïdes liés à une cystéine, notamment de la farnésyl-cystéine, la liaison avec la PLL est effectuée entre une fonction amine de cette dernière et la fonction carboxylique des molécules susmentionnées.

De même, dans le cas de la cystéine et de ses dérivés, la liaison avec la PLL se fait

15 avantageusement entre une fonction amine de cette dernière et la fonction acide de ces molécules.

Alternativement, la cystéine et ses dérivés peuvent être préalablement activés par couplage avec l'anhydride succinique ou glutarique, la liaison se faisant alors entre la fonction ϵ -amine de la PLL et la fonction acide libre de la molécule succinylée ou glutarylée. Ou bien encore,

20 cystéine et ses dérivés peuvent être liés à la PLL par réaction avec le glutaraldéhyde, la réaction se faisant notamment comme décrit par *Geffard et al., Brain Res. : 294, 161-165, (1984)*. Dans le cas du cholestérol et de ses dérivés, le couplage avec la PLL est avantageusement réalisé par l'intermédiaire du groupe hydroxyle du cholestérol.

Dans une variante, le cholestérol et ses dérivés sont adsorbés sur la PLL.

25 Dans le cas des hormones hydrophobes, le couplage avec la PLL est avantageusement réalisé par l'hexaméthylène diisocyanate.

Dans le cas de la vitamine A (acide rétinoïque), la liaison entre cette molécule et la PLL s'effectue entre la fonction aminée de cette dernière et la fonction acide de la molécule.

Dans le cas de la vitamine C (acide ascorbique), la liaison entre cette molécule et la PLL

30 s'effectue entre la fonction amine de cette dernière et la fonction oxo de la molécule.

Dans le cas de la vitamine E ([alpha]-tocophérol), la liaison entre cette molécule et la PLL s'effectue entre la fonction aminée de cette dernière et la fonction acide libre du succinate acide de la molécule.

Dans le cas des acides aminoalkylsulfoniques ou sulfiniques, notamment la taurine, l'homotaurine et l'hypotaurine, la liaison entre ces molécules et la PLL s'effectue par activation préalable des molécules avec un anhydride d'acide (succinique ou glutarique), ou bien par couplage avec le glutaraldéhyde.

Dans le cas des acides aminés, de certains composés indolealkylamines, notamment le tryptophane, et des catécholamines, on peut effectuer la liaison entre ces molécules et la PLL soit directement, soit par couplage avec le carbodiimide, le glutaraldéhyde, un anhydride d'acide ou un chlorure d'acide, par exemple le chloroformiate d'éthyle.

Dans le cas des diamines, on peut effectuer la liaison entre ces molécules et la PLL par couplage avec le glutaraldéhyde ou un anhydride d'acide. La liaison entre la carnitine ou la canosine d'une part, et la PLL d'autre part, s'effectue par couplage avec le carbodiimide.

15 Procédé d'obtention du complexe moléculaire selon l'invention

Le complexe moléculaire selon l'invention peut être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- fourniture d'un ou plusieurs conjugués PLL, comprenant :
 - une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, et
- fourniture d'une ou plusieurs molécules M,
- mise en contact du (ou des) conjugué(s) avec la ou les molécule(s) M dans des conditions permettant la formation de liaison(s) non-covalente(s) entre le (ou les) conjugué(s) et la ou les molécule(s) M.

L'étape de fourniture du (ou des) conjugué(s) comprend préférentiellement la fourniture d'une solution comprenant le (ou les) conjugué(s) dans un solvant hydrophile.

De façon préférée l'étape de mise en contact est réalisée à une température comprise entre environ 4°C et 25°C et dans une solution tamponnée.

De même, l'étape de fourniture de la ou des molécule(s) M comprend préférentiellement la fourniture d'une solution comprenant la ou les molécule(s) M dans un solvant hydrophile.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, le temps de mise en contact du (ou des) conjugué(s) avec la ou les molécule(s) M est compris entre 1 heure et 24 heures.

Utilisations du complexe moléculaire

Les complexes moléculaires ou les compositions le contenant, peuvent être utilisés pour
5 diverses applications, liées en particulier à la nature et à l'efficacité des molécules M.

Dans le cas d'une molécule M présentant une activité pharmacologique, c'est-à-dire un actif pharmacologique, le complexe moléculaire selon l'invention peut être utilisé en tant que médicament.

Préférentiellement pour cette utilisation le complexe moléculaire est administré au sein d'une
10 composition, en particulier une composition selon l'invention.

Le complexe moléculaire selon l'invention est préférentiellement administré par voie intraveineuse, intra musculaire sous cutanée ou orale, spray nasal, buccal ou auriculaire ou cutané et solution ophtalmique.

Avantageusement les complexes de l'invention conservent ou améliorent l'activité
15 pharmacologique d'origine de la molécule M. La présence de conjugués à base de PLL n'affecte donc pas cette activité ex-vivo (ou in-vitro). Il a également été démontré que leur présence n'est pas nuisible à l'action de la molécule M in-vivo (i.e. après administration à un patient).

Par ailleurs, et contre toute attente, la présence des conjugués a également un effet bénéfique sur l'activité pharmacologique de la molécule M en améliorant sa biodisponibilité.

20 Il est donc possible d'utiliser les complexes de l'invention comprenant une molécule M à visée thérapeutique en tant que médicament et dans des méthodes de traitement du corps humain ou animal par thérapie, chirurgie ou bien dans des méthodes de diagnostique.

La nature du traitement dépendra bien évidemment du type d'activité pharmacologique de la molécule M complexée.

25 A titre d'exemple on peut citer le traitement des troubles de l'hémostase.

Les complexes selon l'invention peuvent être utilisés également en vue d'améliorer le goût ou la texture des aliments, de réduire la teneur en lipides, ou d'encapsuler les nutriments, par exemple les vitamines des aliments, afin qu'ils ne se dégradent pas au cours de la durée de conservation. Par ailleurs, ils peuvent être utilisés en vue de fabriquer des emballages
30 permettant de conserver les aliments plus longtemps.

Utilisation des conjugués pour stabiliser des molécules instables en solution

L'invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL, et
- au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, et

5 dans une solution hydrophile, pour :

- améliorer le caractère hydrophile, et/ou
- améliorer la stabilité en solution, et/ou
- améliorer et/ou maintenir en solution l'activité pharmacologique et/ou nutritionnelle et/ou cosmétique et/ou de diagnostic d'un réactif de diagnostic

10 d'une molécule M instable en solution, en formant un complexe moléculaire selon l'invention par liaison non covalente.

Si la molécule M est une substance active pharmaceutique, le maintien de l'activité pharmacologique de la molécule M en solution correspond préférentiellement à une variation de l'activité pharmacologique d'au moins 5% par rapport à l'activité pharmacologique initiale
15 à une température d'au moins 1°C pendant 1 heure.

L'invention vise également selon une variante, l'utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
- au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris
20 entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, et

dans une solution hydrophile contenant une molécule M instable en solution non désirée dans ladite solution, pour former un complexe moléculaire selon l'invention par liaison non covalente et décontaminer ladite solution.

25 L'invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre de ces utilisations. Ce kit comprend au moins une solution hydrophile comprenant au moins un conjugué PLL comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
- au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris
30 entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale.

Procédé d'identification

L'invention vise aussi un procédé d'identification d'un moins un conjugué PLL capable de se lier de façon non covalente à une molécule M présentant une activité pharmacologique, instable en solution, et de maintenir l'activité pharmacologique de ladite molécule M dans

5 une solution hydrophile, ledit procédé comprenant :

a) la fourniture d'une molécule M instable en solution présentant une activité pharmacologique ;

b) la fourniture d'au moins un complexe moléculaire comprenant ladite molécule M selon l'invention ;

10 c) la comparaison entre l'activité pharmacologique initiale et l'activité pharmacologique dudit ou desdits complexes moléculaires comprenant la molécule M ;

d) l'identification d'un ou plusieurs complexes moléculaires dont l'activité pharmacologique en solution en phase liquide est maintenue après la mise en solution ;

e) l'identification d'un conjugué PLL ou d'une combinaison de plusieurs conjugués PLL permettant ledit maintien de l'activité pharmacologique.

Le poids moléculaire de la molécule M est préférentiellement supérieur à 1000 Daltons.

De façon préférée l'étape c) de comparaison est effectuée entre l'activité pharmacologique initiale de la molécule M et l'activité pharmacologique du ou des complexe(s) moléculaire(s) mesurées plusieurs fois à intervalles de temps déterminés à partir de la formation du ou des

20 complexe(s), au moins toutes les 24 heures.

Préférentiellement, l'étape d) d'identification du ou des complexe(s) comprend en outre :

- la comparaison de l'évolution de l'activité pharmacologique de chaque complexe moléculaire testé en fonction du temps ;

- l'identification du ou des complexe(s) dont la variation d'activité pharmacologique est d'au moins 5% par rapport à l'activité pharmacologique de référence de ladite macromolécule à une température d'au moins 1°C pendant au moins 1 heure.

La méthode d'identification selon l'invention comprend donc préférentiellement au moins trois étapes :

- l'étude de la solubilité du (ou des) complexe(s) macromolécule conjugué(s) en solution,

- la vérification que la macromolécule conserve bien son activité pharmacologique d'origine,

et

- le suivi de l'activité pharmacologique du (ou des) complexe(s) macromolécule-conjugué(s) soluble(s), c'est-à-dire ayant « validé » l'étape précédente au cours du temps.

Une analyse in-silico telle que celle décrite ci-dessus est facultative mais avantageuse dans la plupart des cas car elle permet de restreindre relativement rapidement le nombre de conjugués possibles à la formation de complexes solubles et donc de simplifier la suite de l'analyse d'identification.

La solubilité de la macromolécule en présence du ou des conjugués ou de leurs mélanges (éventuellement sélectionnés par la méthode d'analyse in-silico) est étudiée en solution liquide. Les méthodes utilisées pour déterminer une telle solubilité sont standards et connues de l'homme du métier. On pourra néanmoins citer une analyse par mesure de la densité optique ou toute méthode de pharmacopée connue de l'homme du métier.

Les solvants préférés pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention sont les solvants physiologiquement compatibles, de préférence hydrophiles, de préférence encore aqueux tels que l'eau distillée, les tampons phosphate et le sérum physiologique. D'autres solvants comme les alcools en C1-C3 ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) peuvent être présents et dont la quantité totale ne dépasse généralement pas 10% en volume par rapport au volume total de la solution de complexe.

En règle générale, l'insolubilité d'une molécule en solution est visible rapidement à l'oeil nu, en une durée de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes dans certains cas. Par conséquent, une simple étude visuelle des échantillons des différents complexes en solution pourrait suffire à déterminer la ou les solutions de complexes pouvant convenir à la seconde étape d'analyse temporelle d'activité.

Cependant, des analyses de densité optique par exemple, permettent d'obtenir une mesure plus précise de ce phénomène.

L'activité d'origine des complexes solubles est tout d'abord vérifiée puis l'activité est ensuite mesurée à différents intervalles de temps à partir de la formation dudit ou desdits complexes, de préférence toutes les heures, de préférence encore toutes les 24 heures, puis tous les 3-4 jours.

Pour une molécule à visée thérapeutique, la mesure de l'activité pharmacologique peut se faire à partir de n'importe quelle méthode d'analyse appropriée sans aucune limitation. Ces méthodes d'analyse sont bien connues de l'homme du métier et leur utilisation dépend essentiellement de la nature de la macromolécule à visée thérapeutique d'intérêt. A titre

d'exemple, lorsque la macromolécule est un anticorps, on pourra utiliser toute méthode permettant l'évaluation de son affinité avec son antigène et ses analogues telles que les méthodes immuno enzymatiques. Lorsque la macromolécule est une séquence ADN ou ARN par exemple, on pourra utiliser la méthode de spectrométrie MALDI-TDF, électrophorèse ou chromatographie liquide (HPLC) à haute performance.

Lorsque la molécule M n'a pas de visée thérapeutique particulière comme par exemple, les polymères naturels ou synthétiques, les résines, et autres additifs polymériques, on ne peut bien entendu plus parler d'activité pharmacologique ou biologique, mais le procédé tel que décrit précédemment sera mis en œuvre en remplaçant l'activité pharmacologique par les caractéristique(s) ou propriété(s) de la molécule M. Tout ce qui est décrit dans la présente demande en référence à l'activité pharmacologique d'une macromolécule à visée thérapeutique s'applique également en référence aux caractéristiques ou propriétés d'une molécule M d'intérêt non-thérapeutique.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un kit pour la détermination d'un conjugué ou d'une combinaison de plusieurs conjugués permettant le maintien de l'activité pharmacologique d'une ou plusieurs macromolécule(s) en solution, de préférence en phase liquide, comprenant au moins deux conjugués monofonctionnels ou polyfonctionnels identiques ou différents ou au moins deux mélanges de conjugués monofonctionnels ou polyfonctionnels identiques ou différents, et dans lequel chacun desdits conjugués comprend une chaîne principale de type PLL linéaire alpha et une ou plusieurs molécules ayant chacune un poids moléculaire d'au moins 50 Daltons et d'au plus 1000 Daltons liée de façon covalente à ladite chaîne principale.

Le kit selon l'invention peut comprendre au moins deux conjugués ou mélanges de conjugués PLL tels que définis précédemment, de préférence entre deux et dix.

La nature chimique des conjugués PLL pouvant être inclus dans le kit selon l'invention est telle que décrite dans la présente demande.

Selon une variante, le kit selon l'invention comprend des conjugués PLL ou des mélanges de conjugués conditionnés dans des récipients séparés. Les récipients pouvant être utilisés sont par exemple des flacons ou des doses à usage unique.

Le kit permet de faire un screening rapide par le laboratoire pour le choix des composés PLL-F1 et PLL-F2 qui correspond le mieux à la recherche de stabilité.

Stabilité et mesure d'efficacité compléteront l'analyse et permettront de valider si oui ou non la macro molécule est «traitable» avec un composé PLL-F et d'orienter les composés qui seront greffés par liaisons non covalente.

EXEMPLE ET EXPÉRIMENTATIONS

- 5 Les propriétés remarquables des complexes selon l'invention ont été mises en évidence par les expérimentations décrites ci-après

Appareillages et méthodes

Etude «in silico»

- 10 L'analyse «in silico» est une analyse entièrement réalisée au moyen d'un ordinateur et du logiciel Pymol. Elle permet de déterminer et sélectionner les conjugués PLL particuliers pouvant interagir avec une molécule M donnée en fonction de la répartition des acides aminés polaires et donc en fonction des charges de la molécule M.

Les sources utilisées sont les suivantes :

- Protéines humaines : Pubmed/Protein Data Base/Uniprot
- 15 - Immunoglobuline d'isotypie G : Saphire EO *et al.* Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. Science. 2001
- Facteur de coagulation VIII : Ngo JC *et al.* Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. Structure. 2008
- Facteur de coagulation IX : Wang, S. *et al.* Studies of benzothiophene template as
20 potent factor IXa (FIXa) inhibitors in thrombosis. J.Med.Chem. 2010
- Hémoglobine : Safo, M. K. *et al.* The enigma of the liganded hemoglobin end state: a novel quaternary structure of human carbonmonoxy hemoglobin. Biochemistry 2005.
- Albumine : Bhattacharya, A.A. *et al.* Binding of the general anesthetics propofol and
25 J.Biol.Chem.

Le logiciel utilisé pour l'étude des structures protéiques est Pymol tel que décrit sur le site de PyMol de Schrödinger.

«Sédimentation»

- 30 En biochimie, la sédimentation est la séparation de protéines en solution qui ont la capacité de sédimenter dans un champ centrifuge élevé.

On pratique l'ultracentrifugation et dans ce cas les molécules sont mises en mouvement et sédimentées par suite de leur densité qui est supérieure à celle du solvant. On peut donc

déterminer différentes macro molécules et leur masse molaire ainsi que leur constante de sédimentation mesurée en Svedberg (S).

«centrifugation»

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge.

L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse.

Au cours de cette opération de séparation, les composés dans le fluide situés à une distance r de l'axe de rotation sont soumis à différentes forces :

- La force de pesanteur descendante F_p
- La poussée d'Archimède ascendante F_a
- Une force de friction F_v
- La force centripète F'_c
- La force centrifuge F_c

La séparation s'opère par l'action de la force centrifuge F_c sur les composés. Cette force centrifuge, exprimée en newtons, est donnée par la relation $F_c = m\gamma c$ avec $\gamma c = r\omega^2$ en m/s^2 dont :

- La masse m du composé à séparer
- La distance r du tube à l'axe de rotation de la centrifugeuse
- La vitesse angulaire ω exprimée en radians par seconde ou en tours par minute.

Le rapport de la force centrifuge F_c sur le poids F_p est appelé intensité de la pesanteur artificielle et s'exprime en "G". Les valeurs utilisées en centrifugation sont d'environ 400 à 10 000 G, ce qui correspond à des vitesses de rotation de l'ordre 2 000 à 10 000 tr/min suivant le rayon des rotors.

Certaines applications comme la séparation des macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques), nécessite la méthode d'ultracentrifugation mise au point par Svedberg qui utilise des intensités de pesanteur artificielle très élevées de l'ordre de 200 000 G, et qui nécessite de ce fait des vitesses de rotation de plusieurs dizaines de milliers de tours par minute.

«Densité optique»

L'absorbance ou densité optique mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse.

L'absorbance diffère selon la nature de la substance étudiée, selon la longueur d'onde sous laquelle elle est analysée, et selon la concentration de cette substance dans le milieu traversé. Ce milieu peut être solide, liquide ou gazeux, pour autant qu'il soit transparent. Elle est mesurée par un spectrophotomètre. La loi de Beer-Lambert établit une proportionnalité entre

5 la concentration d'une entité chimique en solution (ou la pression partielle de cette entité en phase gazeuse), l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution.

La concentration est exprimée en mol.L⁻¹ ou en mol.m⁻³.

«ELISA»

- 10 L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorophore.

Le protocole «ELISA» dans le cadre de l'invention est le suivant :

- 15 *Expériences de «titre» et «d'affinité» :*

- Sensibilisation des puits «maxisorp» :

Chaque puits reçoit 200 µl d'une solution de tampon carbonate 0,05 M (pH = 9,6) contenant l'antigène à la concentration de 10µg/ml. Des puits contrôles sont réalisés avec la protéine porteuse modifiée par l'agent couplant à la même concentration. Les plaques sont mises

20 heures à 4°C sous agitation.

- Saturation :

Les plaques sont vidées puis remplies par 200 µl de tampon «PBS-Tw Sérum albumine bovine (BSA) 2,5g/l ». Les plaques sont mises à incuber pendant 1 heure à 37 °C.

- Lavages :

- 25 Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBS-Tw.

- Incubations des anticorps :

Les anticorps sont dilués dans différents tampons :

- Le tampon contrôle : le même que le tampon de saturation
 - Le tampon «tests» : c'est du tampon de saturation contenant un
- 30 composé PLL-F.

Ainsi, trois solutions, c'est-à-dire trois concentrations différentes (10⁻⁴M, 10⁻⁵M et 10⁻⁶M) ont été testées par conjugué PLL-F.

Les PLL-F testés sont les suivants :

o Méthionine-G-PLL

o Glutathion-G-PLL

o Taurine-G-PLL

5 o Cystéine-G-PLL

Les anticorps ainsi dilués sont déposés sur la plaque à raison de 200 µl par puits. Ce test comprend une étude de dilution de l'anticorps (1:2 500 à 1:80 000) et une étude d'affinité (dilution 30 de l'antigène de 1.10^{-6} à 1.10^{-12} M).

L'étude de dilution de l'anticorps permet de déterminer la concentration en anticorps et donc de déterminer la dilution en anticorps à utiliser pour l'étude d'affinité et de spécificité.

[Mangas et al. Chapter 1. Brain Molecules : From Vit to molecules for axonal guidance. 2008].

L'absence de signal à la fin du test ELISA (A) indique que tous les sites d'anticorps reconnaissent la cible, c'est à dire qu'il a une haute affinité pour la cible. Un signal élevé à la fin de l'essai (B) est interprété comme une faible affinité de l'anticorps pour l'antigène.

15 [Mangas et al. Chapter 1. Brain Molecules : From Vit to molecules for axonal guidance. 2008]

- Lavages :

Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBS-Tw (Tw=tween)

- Incubation des anticorps secondaires :

Les puits reçoivent 200 µl de tampon «PBS-Tw, BSA 2,5g/l» contenant des immunoglobulines dirigées contre les IgG de l'espèce hôte marquées à la peroxydase et diluées au 1/10 000. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C.

- Lavages :

Les plaques sont vidées et lavées 3 fois avec du PBS-Tw.

- Révélation :

25 Les puits reçoivent 200 µl de Tampon de révélation (Citrates 50 mM, Phosphate 100 mM, H₂O₂ 0,03%, pH5) additionnée d'ortho-phénylène diamine à 0,2%.

On laisse la coloration se développer à l'obscurité pendant 10 minutes et on stoppe la réaction à l'aide 50 µl d'HCl 2N par puits.

La densité optique est ensuite lue à 492 nm.

30 «Dot Blot»

Dans un «dot blot», on transfère les acides nucléiques (ADN ou ARN) ou les protéines depuis un milieu liquide directement sur une membrane, sans séparation préalable. Le transfert peut

être réalisé par diffusion simple, par diffusion dans un champs électrique (électrodiffusion) ou par aspiration sous vide.

La détection est similaire à celles utilisées dans les transferts avec séparation : par exemple des séquences de nucléotides pour l'ADN ou l'ARN ou des anticorps pour les protéines.

5 Protocole « Dot Blot » dans le cadre de l'invention :

A titre d'exemple, un anticorps monoclonal de souris (AcM) a été pris comme modèle: anti-11DehydroThromboxane B2 (11DHTB2-BSA), clone 2E1-B4 (IgG1, K) (surnageant de cellules).

Le composé antigénique correspondant : anti-11DehydroThromboxane B2-BSA.

- Sensibilisation de la membrane de nitrocellulose :

- 10 Transfert de l'antigène depuis un milieu liquide directement sur une membrane, par aspiration sous vide. Chaque puits reçoit 200 µl d'une solution de tampon Tri-NaCl (TBS) 1X contenant l'antigène. Des puits contrôles sont effectués avec la protéine porteuse modifiée par l'agent couplant à la même concentration.

Le système est mis sous vide à température ambiante pendant 1h.

15 - Saturation :

Retirer la membrane et faire des légères coupures pour délimiter les futures « bandes de dépôt ». Immerger ensuite la membrane dans du tampon de saturation «TBS 1X-Tw, BSA 1%I» pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.

- Lavages :

- 20 La membrane est ensuite lavée une fois avec du TBS 1x .

- Incubation des anticorps :

Découper la membrane en bandes de dépôt. Chaque bande est immergée dans une solution contenant l'anticorps à une dilution donnée à 4°C pendant 16h. C'est-à-dire que les anticorps sont dilués dans différents tampons:

- 25
- Le tampon contrôle : le même que le tampon de saturation
 - Le tampon « tests » : c'est du tampon de saturation contenant un composé PLL-F. Ainsi, trois solutions, c'est-à-dire trois concentrations différentes ($10^{-4}M$, $10^{-5}M$ et $10^{-6}M$) ont été testées par composé PLL-F.

- 30 Les PLL-F testés sont les suivants :

o Méthionine-G-PLL
o Glutathion-G-PLL

o Taurine-G-PLL

o Cystéine-G-PLL

Ce test permet d'étudier l'influence du composé PLL-F sur l'interaction Ag/Ac en suivant la densité du « spot » de dot-blot.

5 - Lavages :

Les bandes sont lavées 3 fois avec du TBS1X-TW 0,005%.

- Incubation des anticorps secondaires

Les bandes sont immergées dans du tampon TBS1XTW (0,005%)-BSA(0,1%) contenant des immunoglobulines dirigées contre les IgG de l'espèce hôte marquées à la peroxydase et
10 diluées au 1/5 000 pendant 1h à température ambiante sous agitation.

- Lavages :

Les bandes lavées 3 fois avec du TBS1X-TW 0,005% et un dernier lavage au TBS1X pour enlever la mousse.

- Révélation :

15 Les bandes sont immergées dans du tampon de révélation. La coloration se développe à l'obscurité pendant 10 minutes et la réaction est stoppée à l'aide 50 µl d'HCl 2N par bande. L'intensité des spots est estimée par l'expérimentateur.

«Comptage cellulaire»

La méthode utilisée est la méthode de comptage par Cellule de Malassez et bleu de trypan.

20 Le bleu de trypan est un réactif chromophore (couleur bleue) chargé négativement et qui n'interagit pas avec la membrane si cette dernière est intacte. Il ne va donc colorer que les cellules endommagées, permettant de déterminer la viabilité d'un échantillon. Les échantillons sont dilués puis mélangés avec le bleu de trypan. Une fois placés sur une cellule de comptage classique (Cellule de Malassez), le nombre de cellules totales est déterminé puis
25 les cellules apparaissant de couleur bleue (cellules avec membrane endommagée) sont à leur tour dénombrées. La biomasse est déterminée à partir du nombre total de cellules alors que la viabilité est déterminé à partir de cette formule :

$$\text{Viabilité} = [n(\text{cellules bleues})/n(\text{total})] \cdot 100\%$$

Une cellule de Malassez est une lame spéciale quadrillée qui permet le comptage de
30 différents types de cellules.

La totalité de la cellule de Malassez est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont : Long.= 0,25 mm / larg.= 0,20 mm / Prof. = 0,20 mm. Le volume total de la cellule est de 1

mm³ (100x2,5 x 0,2 x 0,20). Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales (0,25 mm) et de 10 bandes horizontales (0,20 mm) formant ainsi 100 rectangles,

On ne compte les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule.

- 5 On totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle.

Arbitrairement, il est convenu de ne tenir compte que des cellules positionnées sur les côtés droits et inférieurs.

On calcule le nombre moyen de cellules par rectangle (total des cellules observées dans 10 rectangles divisé par le nombre de rectangles comptés). On multiplie le nombre obtenu par

- 10 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par mm³.

«IRFT»

Le spectromètre Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) est un outil d'analyse très utilisé pour l'identification et la quantification de molécules et protéines. La région principale de la

- 15 électromagnétique. Le nombre d'onde est défini par l'inverse de la longueur d'onde, exprimé en centimètre. La spectroscopie peut être définie comme l'étude de l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière. Ainsi cette technique permet d'identifier les groupes fonctionnels chimiques de toute molécule via les vibrations caractéristiques de ses liaisons chimiques. Le résultat obtenu est un spectre IR de la molécule étudiée, soit en mode
- 20 transmittance, soit en mode d'absorbance, où les pics sont interprétables grâce à des tables de corrélation de fréquences des vibrations de valence. Les analyses effectuées sur les conjugués Poly-L-lysine permettent de vérifier le greffage des petites molécules sur la PLL (shift sur les pics de l'amide de la PLL) et de déterminer les pics spécifiques aux petites molécules greffées. Il est observé une modification de l'allure spectrale d'un mélange PLL-F et
- 25 molécule M, en comparaison avec les spectres d'origine du conjugué PLL-F et molécule M.

Synthèse des conjugués selon l'invention

La synthèse des conjugués selon l'invention a été réalisée conformément aux protocoles et indications décrits dans la demande de brevet WO9615810.

- Dans ce qui suit, les molécules de poids moléculaire d'au moins 50 Daltons et d'au plus 1000
- 30 Daltons liées de façon covalente à la chaîne principale de la PLL seront dénommées «molécules F».

Pour des raisons de simplification de la notation, les conjugués selon l'invention sont identifiés par l'abréviation : «molécule F» - «type de couplage» - PLL.

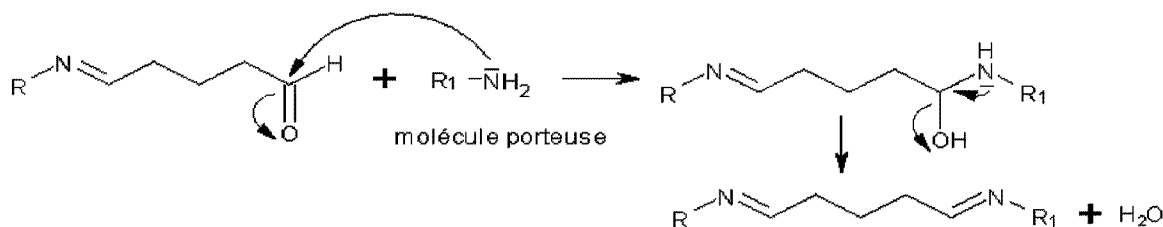
Par exemple, le conjugué «cystéine-G-PLL» correspond à une cystéine greffée sur une PLL par l'intermédiaire d'un bras espaceur (ou linker en terminologie anglo-saxonne) de type glutaraldéhyde. Le conjugué «orotyl-PLL», quant à lui, correspond à l'acide orotique greffé sur une PLL par l'intermédiaire d'un linker de type chlorure d'acide.

Procédure générale de synthèse

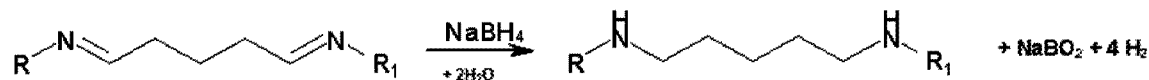
D'une manière générale, deux types d'activation concernent les molécules F, suivant leur famille moléculaire (acides aminés ou autres), la synthèse par activation au glutaraldéhyde et la synthèse par activation par un chlorure d'acide.

Les molécules F activées par la voie de synthèse du glutaraldéhyde et greffées sur la PLL suivent les réactions suivantes :

- 1ère étape : réaction de condensation et formation des imines



- 2ème étape : réduction des imines instables



Chaque molécule F est activée par le glutaraldéhyde (G), qui agit comme agent couplant en activant le groupe amine de la petite molécule. La réaction de condensation forme des imines. Ce composé intermédiaire, petite molécule et agent couplant, est lié sur le groupe amine epsilon du résidu lysyl de la poly-L-lysine, formant une liaison amide. Les imines instables sont stoppées par borohydrure de sodium. Ce produit est purifié par dialyse dans des solutions tampons.

A titre d'exemple on peut citer la synthèse du composé cystéine-G-PLL. Le procédé comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

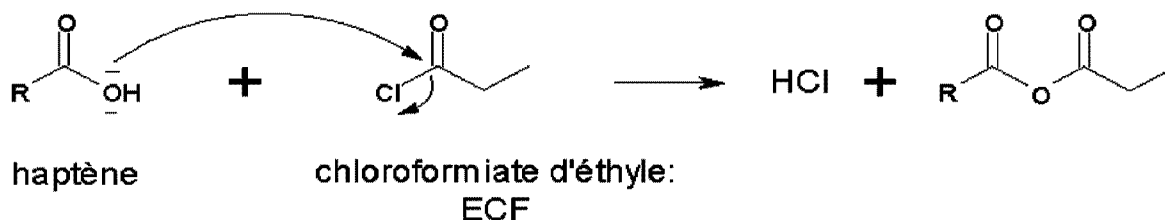
- Pesée de la cystéine : 400 mg

30

- Solubilisation dans un tampon acétate : 20 ml
- Activation par glutaraldéhyde 5% : 6 ml
- Greffage sur la PLL : 10 ml
- Réduction des imines par NaBH₄ 5M : 2 ml

- 5 - Purification par dialyse

Les molécules F activées par la voie de synthèse de l'éthyl chloroformiate et greffées sur la PLL suivent les réactions suivantes :



Chaque molécule F est activée par l'éthyl chloroformiate (ECF), qui agit comme agent couplant en activant le groupe carboxylique de la petite molécule. Ce composé intermédiaire, petite

10 molécule et agent couplant, est lié sur le groupe amine epsilon du résidu lysyl de la poly-L-lysine, formant une liaison amide. Ce produit est purifié par dialyse dans des solutions tampons.

A titre d'exemple on peut citer la synthèse du composé orotyl-PLL. Le procédé comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 15 - Pesée de l'acide orotique : 400 mg
- Solubilisation dans le méthanol : 20 ml
- Ajout de triéthylamine : 0,4 ml
- Activation par éthyl chloroformiate : 0,25 ml
- Greffage sur la PLL : 10 ml
- 20 - Purification par dialyse

Caractérisation des conjugués selon l'invention

La caractérisation des conjugués selon l'invention a été effectuée par la technique analytique de l'infra-rouge à Transformée de Fourier (IRTF). Cette technique spectroscopique permet d'identifier le greffage et les pics spécifiques de la petite molécule sur la PLL. Bien que cette

25 méthode soit généralement très efficace, d'autres méthodes pourront également être utilisées telles que, par exemple, la RMN, ou la dynamisation de lumière ou la cristallographie.

Des exemples de caractérisation de conjugué selon l'invention sont reproduit dans les figures 1A à 1E.

Formation des complexes de l'invention

Procédure générale

- 5 Dans un réacteur, on introduit le(s) conjugué(s) selon l'invention synthétisé(s) à l'étape précédemment décrite et la macromolécule d'intérêt avec inertage à l'azote le cas échéant selon le Protocole spécifique à la molécule M (Cf. 4)

Formation d'un complexe selon l'invention comprenant un anticorps monoclonal de souris (AcM)

- 10 Dans cet exemple, la molécule M est un anticorps monoclonal de souris (AcM).

Pour l'étude in vitro les conditions sont les suivantes :

L'AcM (surnageant de cellules) : anti-11DehydroThromboxane B2 (11DHTB2-BSA), clone 2E1-B4 (IgG1, K)

Le composé antigénique correspondant : anti-11DehydroThromboxane B2-BSA.

- 15 Tampon dilution AcM :

Tampon contrôle TBS1X

Composés PLL-F testés : ie Tampon Contrôle + PLL-F

- Cystéine-G-PLL (10-4M, 10-5M et 10-6M)
- Méthionine-G-PLL (Idem)
- 20 - Glutathion-G-PLL (Idem)
- Taurine-G-PLL (Idem)

Formation d'un complexe selon l'invention comprenant le Facteur VIII

Dans cet exemple, la molécule M est le facteur VIII.

- 25 Le facteur VIII joue un rôle central dans la coagulation. Il s'agit du cofacteur de facteur IX. Le facteur VIII, activé par la thrombine, devint le catalyseur de la réaction d'activation du facteur X par le facteur IX activé, en présence d'ion calcium et de phospholipides. La réaction d'activation du facteur X est accélérée environ 200 000 fois en présence du facteur VIII.

- Le facteur X activé acquiert une activité catalytique qui lui permet de transformer la prothrombine en thrombine. Celle-ci dégrade le fibrinogène en fibrine. Le caillot ainsi formé
30 sera stabilisé par le facteur XIII, ce qui permet l'arrêt du saignement.

Également appelé facteur Christmas ou facteur antihémophilique B, le facteur IX est l'un des intervenants indispensables de la coagulation sanguine. La protéine (57-kDa vitamin K-

dependent procoagulant glycoprotein), codée par le gène F9, se trouve à l'état inactif dans la circulation sanguine. Lorsqu'un vaisseau est endommagé, des éléments étrangers s'infiltrant. Dès qu'elle entre en contact avec l'un d'eux, elle s'active et permet la synthèse d'une enzyme, la thrombokinasé, qui intervient dans la suite des réactions de la coagulation aboutissant à la formation d'un caillot sanguin. Dans le cas de l'absence de ce facteur IX, les personnes souffrent d'hémophilie B.

- Etude in-silico

La structure protéique du facteur VIII est représentée sur la figure 2.

Le logiciel permet de visualiser en couleur sur la structure 3D représentée sur la figure 2 :

- 10 ○ les acides aminés à chaîne latérale polaire sans fonction acide-base : sérine, asparagine, thréonine, glutamine
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base anionique : aspartate, glutamate.
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base
- 15 cationique : lysine, arginine
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base neutre : cystéine, tyrosine, histidine

Le tableau ci-dessous représente le nombre de fonctions relevées par cette méthode

Facteur VIII	AA sans fonction Acide-Base	AA fonction Acide-Base Anionique	AA fonction Acide-Base neutres	AA fonction Acide-Base Cationique
Nombre total	218	123	122	121
Nombre de résidus en surface	135	96	79	101

Facteur VIII	Total	Représentation en % par rapport au total des AA
Nombre total	584	40
Nombre de résidus en surface	411	28

Formation d'un complexe selon l'invention comprenant une hémoglobine

Dans cet exemple, la molécule M est une hémoglobuline.

L'activité de l'hémoglobine est mesurée par saturation en oxygène. L'hémoglobine humaine est constituée de quatre chaînes identiques deux à deux : deux chaînes α de 141 acides aminés chacune et de deux chaînes β de 146 acides aminés chacune (ce qui donne un total de 574 acides aminés pour l'hémoglobine). Chacune de ces chaînes est associée à un groupement prosthétique : l'hème. On la symbolise par « Hb ». Une molécule d'hème est constituée d'un ion fer complexé par une porphyrine.

10 - Etude in-silico

La structure protéique de l'hémoglobine est représentée sur la figure 3.

Le logiciel permet de visualiser en couleur sur la structure 3D représentée sur la figure 3 :

- les acides aminés à chaîne latérale polaire sans fonction acide base : sérine, asparagine, thréonine, glutamine
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base anionique : aspartate, glutamate.

- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base cationique : lysine, arginine
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base neutre : cystéine, tyrosine, histidine

5 Le tableau ci-dessous représente le nombre de fonctions relevées par cette méthode :

Hémoglobine	AA sans fonction Acide-Base	AA fonction Acide-Base Anionique	AA fonction Acide-Base neutres	AA fonction Acide-Base Cationique
Nombre total par Catégorie	92	54	56	56
Nombre de résidus en surface	92	50	42	50

Hémoglobine	Total	Représentation en % par rapport au total des AA
Nombre total par Catégorie	258	45
Nombre de résidus en surface	234	41

Formation d'un complexe selon l'invention comprenant une albumine

Dans cet exemple, la molécule M est une albumine.

10 L'albumine sérum humaine est l'une des protéines les plus abondantes dans le système circulatoire. Elle joue un rôle clé dans le transport des acides gras, des métabolites et des médicaments et stimule fortement la distribution des médicaments dans le corps. Sans une protéine pour distribuer les médicaments tels que des antibiotiques, il serait beaucoup plus difficile de combattre la maladie ; l'albumine humaine permet à certaines substances actives de se lier et d'être transportées dans tout le corps. La structure de l'albumine humaine représente un modèle quaternaire. La masse moléculaire de la protéine est 67000, avec 585

15 acides aminés. La protéine a environ 67% de l'hélice alpha et étonnamment aucun β feuillet.

Sa structure permet de se lier à une grande variété de molécules naturelles et synthétiques. L'albumine humaine est impliquée dans le maintien de la pression osmotique colloïdale. La pression osmotique colloïdale est une forme de pression qui doit être appliquée pour empêcher la quantité excessive d'eau à travers la membrane semi-perméable.

5 - Etude in-silico

La structure protéique de l'albumine est représentée sur la figure 4.

Le logiciel permet de visualiser en couleur sur la structure 3D représentée sur la figure 4 :

- les acides aminés à chaîne latérale polaire sans fonction acide base : sérine, asparagine, thréonine, glutamine
- 10 ○ Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base anionique : aspartate, glutamate.
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base cationique : lysine, arginine
- Les acides aminés à chaîne latérale polaire avec fonction acide base neutre :
15 cystéine, tyrosine, histidine

Le tableau ci-dessous représente le nombre de fonctions relevées par cette méthode

HSA	AA sans fonction Acide-Base	AA fonction Acide-Base Anionique	AA fonction Acide-Base neutres	AA fonction Acide-Base Cationique
Nombre total	89	96	68	82
Nombre de résidus en surface	75	83	51	80

HSA	Total	Représentation en % par rapport au total des AA
Nombre total	335	57%
Nombre de résidus en surface	289	49%

Exemples d'Analyse de stabilité et de solubilité en solution et en culture cellulaire

a. Stabilité des Immunoglobulines (Ig) en solution aqueuse dans différents tampons pour des applications thérapeutiques

Pour cela, des composés PLL-F sont utilisés. Deux démarches sont appliquées :

- 5
 - Etude « in silico » par la recherche bibliographique et l'étude de la structure des Ig
 - Etude « in vitro » par la technique ELISA / Dot Blot :
 - « Binding » direct
 - Affinité
 - 10 • Spécificité

b. Stabilité des hybridomes monoclonaux en solution aqueuse dans différents «milieux de culture»

Pour cela, des composés PLL-F sont utilisés. L'évaluation est réalisée par une étude « in vitro » qui comprend :

- 15
 - L'observation de l'aspect des cellules avec les différents « milieux de culture »
 - Le comptage cellulaire pour le suivi de la croissance

Applications

Les complexes selon l'invention peuvent être utilisés dans de nombreuses applications thérapeutiques ou non thérapeutiques.

- 20 Pour le Facteur VIII par exemple : aujourd'hui en cas de nécessité l'hémophile doit hydrater sa solution lyophilisée, puis préparer le bon dosage et enfin se l'injecter. Avec l'invention le patient aura juste à prendre la seringue pré-remplie mise à sa disposition et s'injecter le bon nombre d'unités. Plus de risque de *sous* ou *sur* dosage, plus de risque de contamination durant la préparation et donc une sécurité totale pour le patient.
- 25 Dans le domaine du diagnostic l'utilisation de complexes selon l'invention permet des dosages plus facile et dans le nutraceutique il permet de mettre en solution un actif stable dans un yaourt ou autre par exemple.

- 30 Selon certains aspects, une ou plusieurs des réalisations suivantes sont décrites :

Réalisation 1. Complexe moléculaire comprenant :

- au moins un conjugué polylysine (PLL), comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et
- 5 - au moins une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine,
- 10 dans lequel le ou les conjugué(s) et la ou les molécule(s) M sont liés par liaison non covalente.
- Réalisation 2. Le complexe moléculaire selon la réalisation 1, caractérisé en ce que le rapport entre la concentration molaire du ou des conjugué(s) et celle de la ou des molécule(s) M est compris entre 1 et 30.
- Réalisation 3. Le complexe moléculaire selon la réalisation 1 ou 2, caractérisé en ce que le
- 15 rapport massique moléculaire et l'aire des pics entre la ou les molécules F et la chaîne principale est d'environ 10 à environ 20.
- Réalisation 4. Le complexe moléculaire selon la réalisation 3, dans lequel le rapport massique moléculaire et l'aire des pics entre la ou les molécules F et la chaîne principale est déterminé par la méthode IRFT.
- 20 Réalisation 5. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 4, caractérisé en ce que la ou les molécule(s) F liée(s) de façon covalente à la chaîne principale est (sont) la cystéine, la méthionine, la taurine, le glutathion ou l'acide thiotique.
- Réalisation 6. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 5, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué
- 25 PLL est une molécule présentant une activité pharmacologique.
- Réalisation 7. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 6, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est une molécule présentant une activité nutritionnelle.
- Réalisation 8. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 7,
- 30 caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est une molécule présentant une activité cosmétique.

Réalisation 9. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 8, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est un réactif de diagnostic.

Réalisation 10. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 9, caractérisé en ce que le poids moléculaire de chaque molécule M est supérieur à 1000 Daltons.

Réalisation 11. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 9, caractérisé en ce que la PLL comprend entre 155 et 394 lysines.

Réalisation 12. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 11, caractérisé en ce que la PLL du conjugué est une chaîne linéaire alpha.

Réalisation 13. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 10, caractérisé en ce que le poids moléculaire de chaque PLL est compris entre 3000 Daltons et 50000 Daltons.

Réalisation 14. Composition comprenant au moins le complexe défini selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13, en solution dans un solvant hydrophile.

Réalisation 15. La composition selon la réalisation 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus du complexe moléculaire, au moins un excipient, un tensioactif ou un véhicule.

Réalisation 16. Procédé d'obtention du complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13, comprenant les étapes suivantes :

- fourniture d'un ou plusieurs conjugués PLL, comprenant :
 - une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée, et
- fourniture d'une ou plusieurs molécules M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle(s) est(sont) mise(s) en solution dans un solvant, caractérisée(s) en ce que la ou les molécule(s) M est(sont) une ou des molécule(s) organique(s) ou, une ou des protéine(s),
- mise en contact du (ou des) conjugué(s) avec la ou les molécule(s) M dans des conditions permettant la formation de liaison(s) non-covalente(s) entre le (ou les) conjugué(s) et la (ou les) molécule(s) M.

Réalisation 17. Le procédé selon la réalisation 16, caractérisé en ce que ladite étape de mise en contact est réalisée à une température comprise entre 4°C et 25°C et dans une solution tamponnée.

5 Réalisation 18. Le procédé selon la réalisation 16 ou 17, caractérisé en ce que l'étape de fourniture du (ou des) conjugué(s) comprend la fourniture d'une solution comprenant le (ou les) conjugué(s) dans un solvant hydrophile.

Réalisation 19. Le procédé selon l'une quelconque des réalisations 16 à 18, caractérisé en ce que ladite étape de fourniture de la ou des molécule(s) M comprend la fourniture d'une solution comprenant la (ou les) molécule(s) M dans un solvant hydrophile.

10 Réalisation 20. Le procédé selon l'une quelconque des réalisations 16 à 19, caractérisé en ce que le temps de mise en contact du (ou des) conjugué(s) avec la (ou les) molécule(s) M est compris entre 1 heure et 24 heures.

15 Réalisation 21. Complexe moléculaire selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13, la molécule M étant une substance active pharmaceutique, pour son utilisation en tant que médicament.

Réalisation 22. Le complexe pour une utilisation selon la réalisation 21, caractérisé en ce que le complexe moléculaire est formulé pour une administration au sein d'une composition selon la réalisation 14 ou 15.

20 Réalisation 23. Le complexe pour une utilisation selon la réalisation 21 ou 22, caractérisé en ce que le complexe moléculaire est formulé pour une administration par voie intraveineuse ; IM sous cutané ou orale ; spray nasal, buccal ou auriculaire ; ou cutanée ; ou en solution ophtalmique.

Réalisation 24. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
- 25 • au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ε)-amine de la chaîne carbonée et

30 dans une solution hydrophile, pour améliorer le caractère hydrophile d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, en formant un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13.

Réalisation 25. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et
- 5 dans une solution hydrophile, pour améliorer la stabilité en solution d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine,
- 10 en formant un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13.

Réalisation 26. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et
- 15 dans une solution hydrophile, pour améliorer en solution l'activité pharmacologique, d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une
- 20 protéine, en formant un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13.

Réalisation 27. L'utilisation selon la réalisation 26, pour, en outre, améliorer en solution l'activité nutritionnelle de la molécule M.

Réalisation 28. L'utilisation selon la réalisation 26 ou 27, pour, en outre, améliorer en

25 solution l'activité cosmétique de la molécule M.

Réalisation 29. L'utilisation selon l'une quelconque des réalisations 26 à 28, pour, en outre, améliorer en solution l'activité de diagnostic comme réactif de diagnostic, de la molécule M.

Réalisation 30. L'utilisation selon la réalisation 26, caractérisée en ce que l'amélioration de l'activité pharmacologique de la molécule M en solution correspond à une variation de

30 l'activité pharmacologique d'au moins 5% par rapport à l'activité pharmacologique initiale de la molécule M à une température d'au moins 1°C pendant 1 heure.

Réalisation 31. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
- au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et

5 dans une solution hydrophile contenant une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant non désirée dans ladite solution, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, pour former un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des réalisations 1 à 13 et

10 décontaminer ladite solution.

Réalisation 32. Procédé d'identification d'un moins un conjugué PLL capable de se lier de façon non covalente à une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisé en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, et de maintenir l'activité pharmacologique de ladite

15 molécule M dans une solution hydrophile, ledit procédé comprenant :

- a) la fourniture d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant présentant une activité pharmacologique ;
- b) la fourniture d'au moins un complexe moléculaire comprenant ladite molécule M,
- 20 tel que défini dans l'une quelconque des réalisations 1 à 13 ;
- c) la comparaison entre l'activité pharmacologique initiale et l'activité pharmacologique dudit ou desdits complexes moléculaires comprenant la molécule M ;
- d) l'identification d'un ou plusieurs complexes moléculaires dont l'activité pharmacologique en solution en phase liquide est maintenue après la mise en solution ;
- 25 et
- e) l'identification d'un conjugué PLL ou d'une combinaison de plusieurs conjugués PLL permettant ledit maintien de l'activité pharmacologique.

Réalisation 33. Le procédé d'identification selon la réalisation 32, caractérisé en ce que le poids moléculaire de la molécule M est supérieur à 1,000 Daltons.

30 Réalisation 34. Le procédé d'identification selon la réalisation 32 ou 33, caractérisé en ce que l'étape c) de comparaison est effectuée entre l'activité pharmacologique initiale de la molécule M et l'activité pharmacologique du ou des complexe(s) moléculaire(s) mesurées

plusieurs fois à intervalles de temps déterminés à partir de la formation du ou des complexe(s), au moins toutes les 24 heures.

Réalisation 35. Le procédé d'identification selon l'une quelconque des réalisations 32 à 34, caractérisé en ce que l'étape d) d'identification du ou des complexe(s) comprend en outre :

- 5
- la comparaison de l'évolution de l'activité pharmacologique de chaque complexe moléculaire testé en fonction du temps ; et
 - l'identification du ou des complexe(s) dont la variation d'activité pharmacologique est d'au moins 5% par rapport à l'activité pharmacologique de référence de ladite macromolécule à une température d'au moins 1°C pendant au moins 1 heure.

10

REVENDEICATIONS

1. Complexe moléculaire comprenant :
 - au moins un conjugué polylysine (PLL), comprenant :
 - une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et
 - au moins une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine,
- dans lequel le ou les conjugué(s) et la ou les molécule(s) M sont liés par liaison non covalente.
2. Le complexe moléculaire selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rapport entre la concentration molaire du ou des conjugué(s) et celle de la ou des molécule(s) M est compris entre 1 et 30.
 3. Le complexe moléculaire selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le rapport massique moléculaire et l'aire des pics entre la ou les molécules F et la chaîne principale est d'environ 10 à environ 20.
 4. Le complexe moléculaire selon la revendication 3, dans lequel le rapport massique moléculaire et l'aire des pics entre la ou les molécules F et la chaîne principale est déterminé par la méthode IRFT.
 5. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la ou les molécule(s) F liée(s) de façon covalente à la chaîne principale est (sont) la cystéine, la méthionine, la taurine, le glutathion ou l'acide thiotique.
 6. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est une molécule présentant une activité pharmacologique.
 7. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est une molécule présentant une activité nutritionnelle.

8. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est une molécule présentant une activité cosmétique.

5 9. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la au moins une molécule M liée de façon non covalente au conjugué PLL est un réactif de diagnostic.

10. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le poids moléculaire de chaque molécule M est supérieur à 1000 Daltons.

10 11. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la PLL comprend entre 155 et 394 lysines.

12. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la PLL du conjugué est une chaîne linéaire alpha.

15 13. Le complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le poids moléculaire de chaque PLL est compris entre 3000 Daltons et 50000 Daltons.

14. Composition comprenant au moins le complexe défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, en solution dans un solvant hydrophile.

15. La composition selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus du complexe moléculaire, au moins un excipient, un tensioactif ou un véhicule.

20 16. Procédé d'obtention du complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, comprenant les étapes suivantes :

○ fourniture d'un ou plusieurs conjugués PLL, comprenant :

25 ▪ une chaîne principale linéaire de PLL et
 ▪ au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée, et

30 ○ fourniture d'une ou plusieurs molécules M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle(s) est(sont) mise(s) en solution dans un solvant, caractérisée(s) en ce que la ou les molécule(s) M est(sont) une ou des molécule(s) organique(s) ou, une ou des protéine(s),

- mise en contact du (ou des) conjugué(s) avec la ou les molécule(s) M dans des conditions permettant la formation de liaison(s) non-covalente(s) entre le (ou les) conjugué(s) et la (ou les) molécule(s) M.

17. Le procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ladite étape de mise en contact est réalisée à une température comprise entre 4°C et 25°C et dans une solution tamponnée.

18. Le procédé selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que l'étape de fourniture du (ou des) conjugué(s) comprend la fourniture d'une solution comprenant le (ou les) conjugué(s) dans un solvant hydrophile.

19. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que ladite étape de fourniture de la ou des molécule(s) M comprend la fourniture d'une solution comprenant la (ou les) molécule(s) M dans un solvant hydrophile.

20. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que le temps de mise en contact du (ou des) conjugué(s) avec la (ou les) molécule(s) M est compris entre 1 heure et 24 heures.

21. Complexe moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, la molécule M étant une substance active pharmaceutique, pour son utilisation en tant que médicament.

22. Le complexe pour une utilisation selon la revendication 21, caractérisé en ce que le complexe moléculaire est formulé pour une administration au sein d'une composition selon la revendication 14 ou 15.

23. Le complexe pour une utilisation selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que le complexe moléculaire est formulé pour une administration par voie intraveineuse ; IM sous cutané ou orale ; spray nasal, buccal ou auriculaire ; ou cutanée ; ou en solution ophtalmique.

24. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
- au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ε)-amine de la chaîne carbonée et

dans une solution hydrophile, pour améliorer le caractère hydrophile d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, en formant un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

5 25. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique
- 10 et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et

dans une solution hydrophile, pour améliorer la stabilité en solution d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine,

15 en formant un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

26. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
 - au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique
- 20 et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et

dans une solution hydrophile, pour améliorer en solution l'activité pharmacologique, d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution

25 dans un solvant, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, en formant un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

27. L'utilisation selon la revendication 26, pour, en outre, améliorer en solution l'activité nutritionnelle de la molécule M.

30 28. L'utilisation selon la revendication 26 ou 27, pour, en outre, améliorer en solution l'activité cosmétique de la molécule M.

29. L'utilisation selon l'une quelconque des revendications 26 à 28, pour, en outre, améliorer en solution l'activité de diagnostic comme réactif de diagnostic, de la molécule M.

30. L'utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que l'amélioration de l'activité pharmacologique de la molécule M en solution correspond à une variation de l'activité pharmacologique d'au moins 5% par rapport à l'activité pharmacologique initiale de la molécule M à une température d'au moins 1°C pendant 1 heure.

31. Utilisation d'au moins un conjugué PLL, comprenant :

- une chaîne principale linéaire de PLL et
- au moins une molécule F ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 Daltons et 1000 Daltons, liée de façon covalente à ladite chaîne principale, caractérisée en ce que la molécule F est non immunogénique et liée de façon covalente à ladite chaîne principale de PLL en position epsilon (ϵ)-amine de la chaîne carbonée et

dans une solution hydrophile contenant une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant non désirée dans ladite solution, caractérisée en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, pour former un complexe moléculaire défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 et décontaminer ladite solution.

32. Procédé d'identification d'un moins un conjugué PLL capable de se lier de façon non covalente à une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant, caractérisé en ce que la molécule M est une molécule organique ou une protéine, et de maintenir l'activité pharmacologique de ladite molécule M dans une solution hydrophile, ledit procédé comprenant :

- a) la fourniture d'une molécule M présentant une diminution ou une perte d'activité lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant présentant une activité pharmacologique ;
- b) la fourniture d'au moins un complexe moléculaire comprenant ladite molécule M, tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 13 ;
- c) la comparaison entre l'activité pharmacologique initiale et l'activité pharmacologique dudit ou desdits complexes moléculaires comprenant la molécule M ;

d) l'identification d'un ou plusieurs complexes moléculaires dont l'activité pharmacologique en solution en phase liquide est maintenue après la mise en solution ;
et

5 e) l'identification d'un conjugué PLL ou d'une combinaison de plusieurs conjugués PLL permettant ledit maintien de l'activité pharmacologique.

33. Le procédé d'identification selon la revendication 32, caractérisé en ce que le poids moléculaire de la molécule M est supérieur à 1,000 Daltons.

10 34. Le procédé d'identification selon la revendication 32 ou 33, caractérisé en ce que l'étape c) de comparaison est effectuée entre l'activité pharmacologique initiale de la molécule M et l'activité pharmacologique du ou des complexe(s) moléculaire(s) mesurées plusieurs fois à intervalles de temps déterminés à partir de la formation du ou des complexe(s), au moins toutes les 24 heures.

35. Le procédé d'identification selon l'une quelconque des revendications 32 à 34, caractérisé en ce que l'étape d) d'identification du ou des complexe(s) comprend en outre :

- 15
- la comparaison de l'évolution de l'activité pharmacologique de chaque complexe moléculaire testé en fonction du temps ; et
 - l'identification du ou des complexe(s) dont la variation d'activité pharmacologique est d'au moins 5% par rapport à l'activité pharmacologique de référence de ladite macromolécule à une température d'au moins 1°C pendant au moins 1 heure.

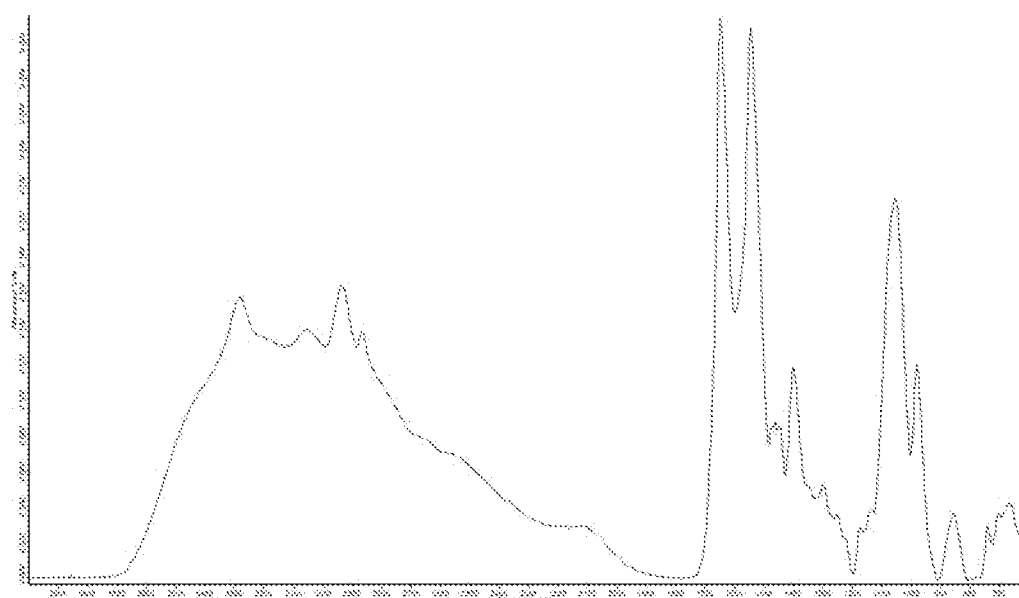


Figure 1A

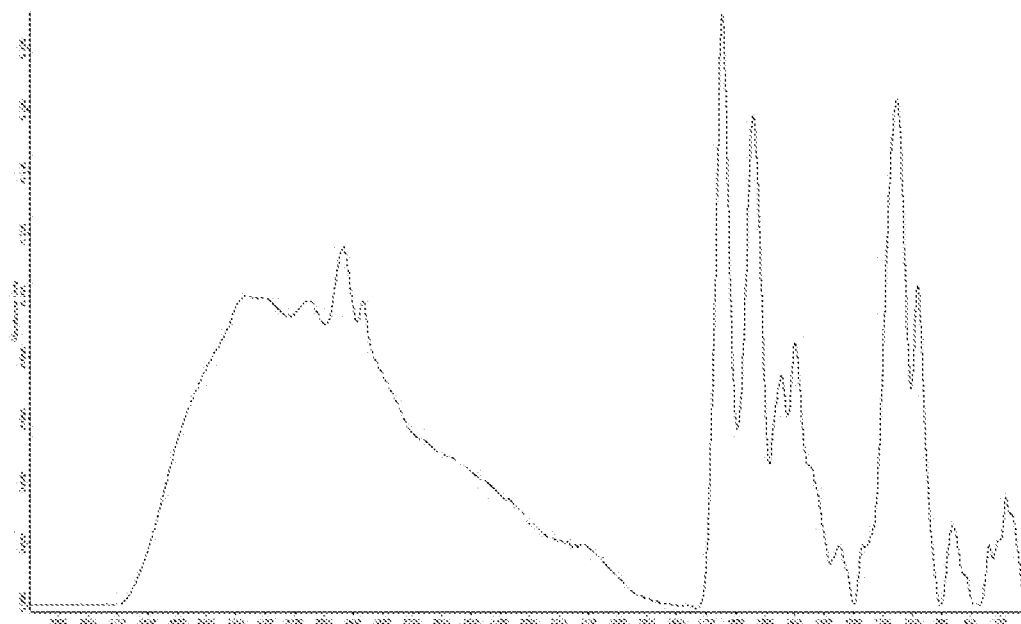


Figure 1B

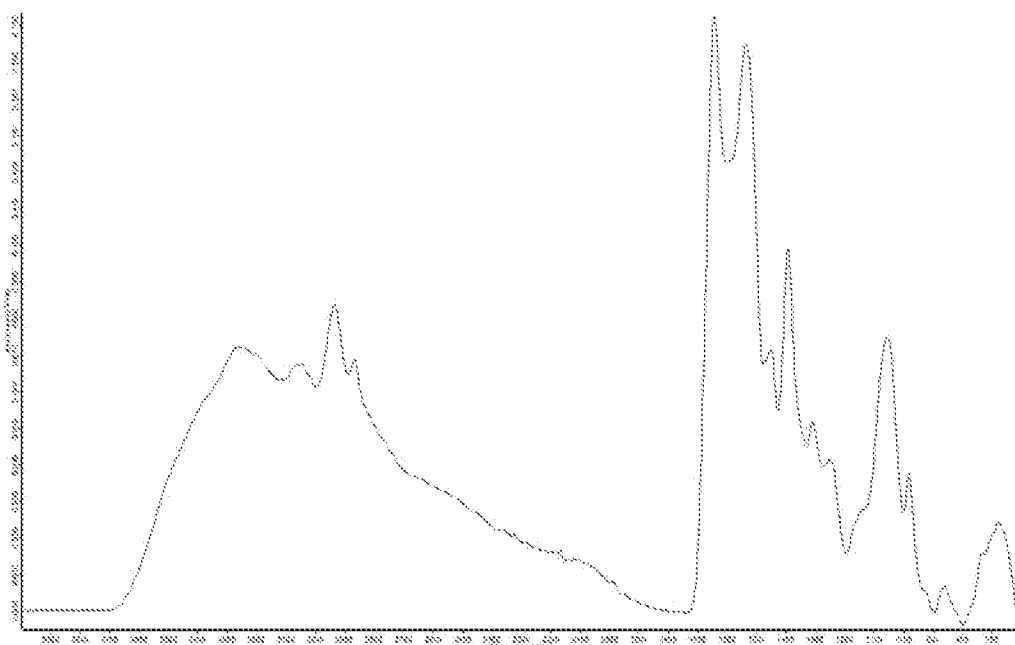


Figure 1C

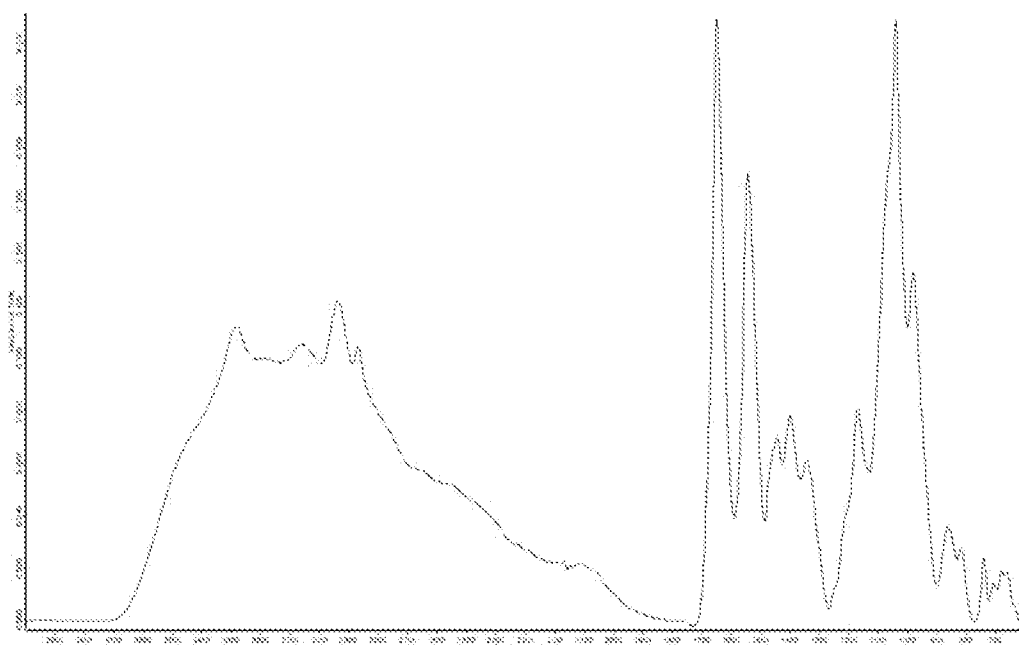


Figure 1D

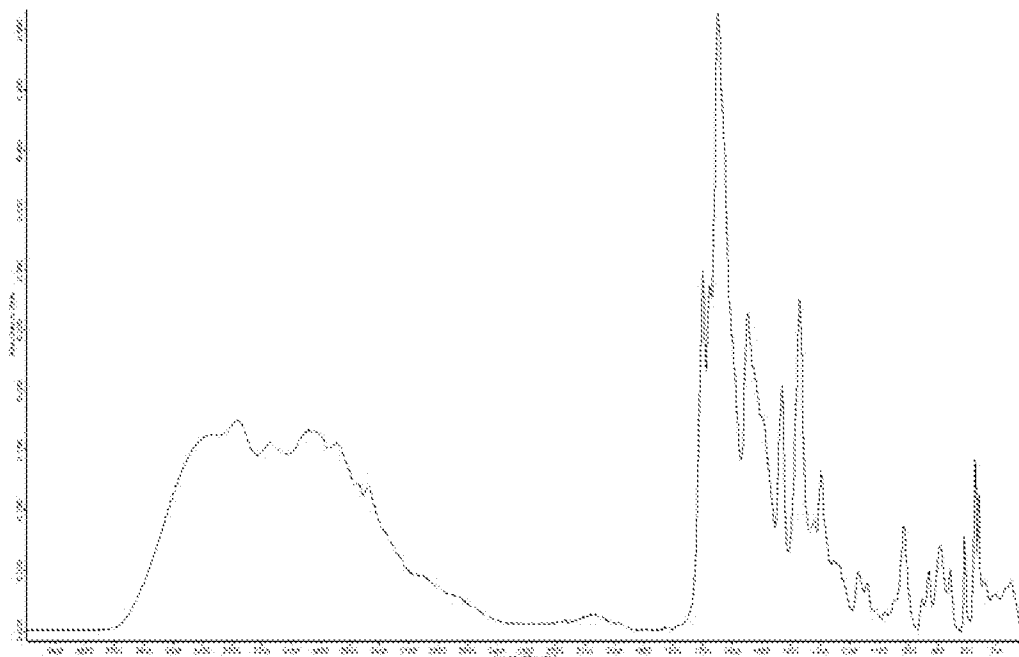


Figure 1E

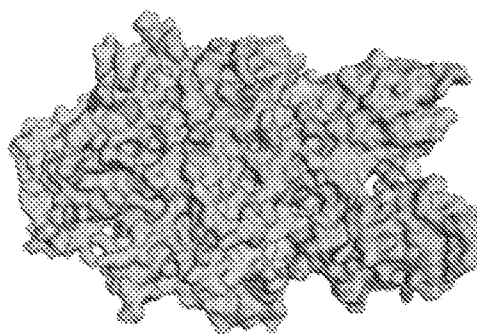


Figure 2

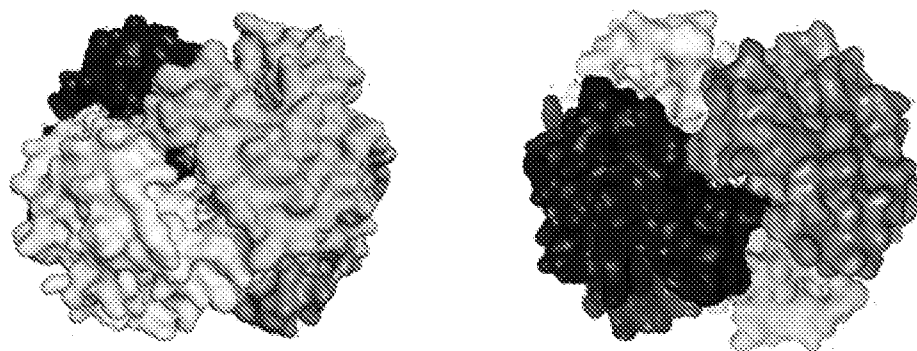


Figure 3

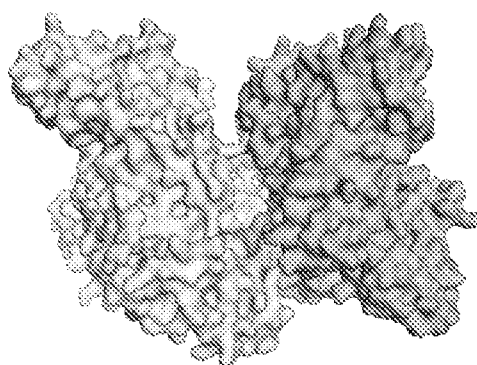


Figure 4

