

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

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

3 143 031

21 N° d'enregistrement national : 22 13003

51 Int Cl<sup>8</sup> : C 07 K 14/05 (2023.01), C 12 N 15/38, C 07 K 19/00,  
C 12 N 15/62, 15/63, A 61 K 38/16, 39/245, 47/42, 47/62,  
A 61 P 35/00, G 01 N 33/68

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 08.12.22.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 14.06.24 Bulletin 24/24.

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

60 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES Etablis-  
sement public national à caractère scientifique culturel et pro-  
fessionnel — FR, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE Etablissement public national à caractère  
administratif — FR et INSTITUT POLYTECHNIQUE DE GRE-  
NOBLE Etablissement public national à caractère scientifique  
culturel et professionnel — FR.

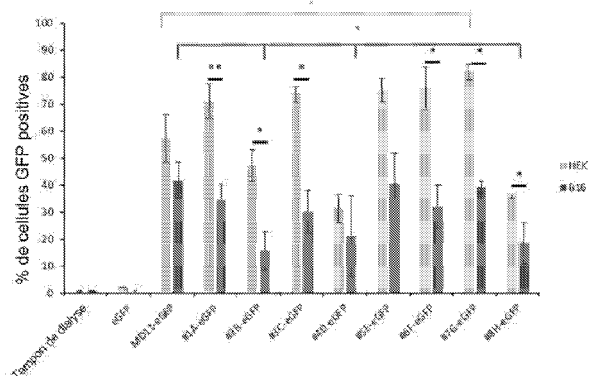
72 Inventeur(s) : LENORMAND Jean-Luc et REYNAUD  
Déborah.

73 Titulaire(s) : UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES Etablissement  
public national à caractère scientifique culturel et professionnel,  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablis-  
sement public national à caractère administratif, INSTITUT POLYTECH-  
NIQUE DE GRENOBLE Etablissement public national à caractère  
scientifique culturel et professionnel.

74 Mandataire(s) : CABINET GERMAIN ET MAUREAU.

54 Nouveaux peptides et leur utilisation en tant que transporteurs pour l'internalisation de molécules d'intérêt dans des cellules cibles.

57 L'invention concerne de nouveaux peptides de péné-  
tration cellulaire comprenant ou consistant en une sé-  
quence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ  
ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5,  
SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8. L'invention  
concerne en outre des protéines de fusion comprenant les-  
dits peptides et une molécule d'intérêt pharmaceutique, dia-  
gnostic ou biotechnologique.  
Figure pour l'abrégé : Fig. 1



FR 3 143 031 - A1



## Description

### **Titre de l'invention : Nouveaux peptides et leur utilisation en tant que transporteurs pour l'internalisation de molécules d'intérêt dans des cellules cibles**

#### **Domaine technique de l'invention**

[0001] L'invention relève du domaine des transporteurs peptidiques pour l'internalisation de molécules d'intérêt dans des cellules cibles. Elle concerne plus particulièrement des nouveaux peptides ou acides nucléiques codant pour de tels peptides, et leurs utilisations en tant que transporteurs pour l'internalisation de molécules d'intérêt dans des cellules cibles. Elle vise également la combinaison de tels peptides avec des molécules d'intérêt, notamment des polypeptides d'intérêt et l'utilisation d'une telle combinaison dans le traitement, le diagnostic ou la prévention de pathologies, notamment le cancer. L'invention concerne en outre une protéine de fusion comprenant un nouveau peptide ayant la propriété de pénétration cellulaire (dit « peptide de pénétration cellulaire » ou « Cell-penetrating peptide, CPP ») objet de la présente invention et un polypeptide d'intérêt, ainsi qu'un acide nucléique codant pour une telle protéine de fusion, un vecteur d'expression comprenant des acides nucléiques codant une telle protéine de fusion, mais aussi une cellule hôte comprenant un tel vecteur d'expression. Enfin, l'invention vise également une composition pharmaceutique comprenant un nouveau peptide objet de la présente invention et un polypeptide d'intérêt.

#### **Technique antérieure**

[0002] Les médicaments issus de biotechnologies, aussi appelés biomédicaments ou médicaments biologiques, ont une place importante dans le traitement des pathologies humaines. Ils comprennent notamment les protéines thérapeutiques (enzymes, hormones de croissance, anticorps monoclonaux, facteurs de croissance, vaccins recombinants, ...), les acides nucléiques (ADN, siARN, ARNm, oligonucléotides, ...), les peptides et les dérivés tels que les acides nucléiques peptidiques (ANP).

[0003] Dans certains cas, il est nécessaire d'utiliser des transporteurs pour que ces biomédicaments soient internalisés dans des cellules cibles. L'internalisation de molécules thérapeutiques dans des cellules fait l'objet de nombreuses recherches dans le but de trouver de nouveaux transporteurs, d'améliorer l'efficacité des transporteurs connus mais aussi des molécules thérapeutiques transportées, d'améliorer leur ciblage au niveau des cellules et de diminuer la dose efficace de certains traitements afin de diminuer le risque de toxicité.

[0004] Plusieurs familles de peptides transporteurs ont déjà été mis en évidence. Ces peptides naturels ou synthétiques appelés PTD (pour « *Protein Transduction Domain* »

en terminologie anglo-saxonne) ou CPP (pour « *Cell-Penetrating Peptides* » en terminologie anglo-saxonne) possèdent la capacité de transporter et transférer dans les cellules des molécules telles que des peptides ou des acides nucléiques selon différents mécanismes d'internalisation cellulaires possible comme l'endocytose, la macropinocytose ou la formation de pores membranaires par exemple.

[0005] Dans leur publication de 2008 "*Expression and purification of Zebra Fusion Proteins and Applications for the Delivery of Macromolecules into Mammalian Cells*" dans la revue *Current Protocols in Protein Science*, 54 : 18.11.1-18.11.29, Lenormand et Rothe décrivent une méthode de production de protéines de fusion comprenant un segment de la protéine ZEBRA et la protéine eGFP ou la  $\beta$ -galactosidase. Lesdites protéines de fusion sont capables d'être internalisées dans les cellules HeLa à une concentration de 0,01  $\mu$ M à 0,3  $\mu$ M.

[0006] La protéine ZEBRA est un activateur transcriptionnel issu du virus Epstein-Barr. C'est une protéine de 245 acides aminés comprenant une région de transactivation en N-terminal (TAD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et une région de dimérisation (DIM) de type leucine zipper. Le domaine C-terminal de ladite protéine interagit avec le domaine leucine zipper conduisant à la formation d'une poche hydrophobe qui stabilise le complexe protéine ZEBRA/ADN.

[0007] Jusqu'à présent, les voies d'internalisation empruntées par les peptides de transport, connus de l'homme du métier, telles que l'endocytose et la macropinocytose, nécessitent une dépense d'énergie importante afin de réaliser ce mécanisme de pénétration intracellulaire. De plus, le mécanisme d'endocytose conduit à l'internalisation des molécules par l'intermédiaire des endosomes dont le contenu subit une dégradation partielle. Seule, une petite fraction des peptides transportés est relarguée dans le cytosol, après rupture de la membrane des endosomes, leur permettant d'exercer leur action au niveau intracellulaire. Par conséquent, à l'échelle de production industrielle, afin d'assurer l'efficacité de la transduction de polypeptides d'intérêt, il est nécessaire de produire une grande quantité de transporteur et de polypeptides d'intérêt. Cela exige parfois une procédure de production ou de purification lourde qui n'est pas réalisable pour tous les types de polypeptides d'intérêt. Par ailleurs, pour certains polypeptides d'intérêt, il est nécessaire de limiter la quantité administrée en raison des risques de toxicité. Il apparaît donc nécessaire d'utiliser des polypeptides de transport plus efficaces dans leur capacité de pénétration cellulaire afin de limiter ces risques.

[0008] La demande de brevet WO2011135222 divulgue l'utilisation d'un fragment peptidique issue de la protéine ZEBRA (de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220) en tant que peptide transporteur permettant d'effectuer une internalisation de polypeptides d'intérêt à des concentrations faibles et d'éviter la dégradation de ces polypeptides d'intérêt par un mécanisme de pénétration direct in-

dépendant des endosomes.

[0009] La publication “*MD11 mediated delivery of recombinant eIF3f induces melanoma and colorectal carcinoma cell death*” de R. MARCHIONE *et al.* en 2015 divulgue l'utilisation d'un complexe formé de la protéine eIF3f fusionnée avec un peptide de pénétration cellulaire pour augmenter la quantité intracellulaire disponible de protéine eIF3f dans les cellules cancéreuses et activer leur apoptose. Le peptide de pénétration cellulaire utilisé est un fragment de séquence de la protéine ZEBRA (de l'acide aminé en position 178 à l'acide aminé en position 220) appelé MD11.

[0010] Il persiste encore aujourd'hui un besoin de trouver de nouveaux peptides transporteurs dont le potentiel de pénétration cellulaire est amélioré et dont la production est facilitée, ceux-ci devant permettre de transporter, à une concentration faible, avec une haute efficacité et une meilleure affinité, des molécules d'intérêt dans les cellules cibles tout en garantissant leur bonne stabilité et faible toxicité dans lesdites cellules.

### **Présentation de l'invention**

[0011] La présente invention a pour objectif de fournir de nouveaux peptides comme transporteurs destinés à l'internalisation de molécules d'intérêt dans des cellules cibles. Ces nouveaux peptides sont des mutants d'un fragment peptidique de la protéine ZEBRA. Ce fragment dont la séquence est la séquence SEQ ID NO : 1 correspondant à la séquence peptidique de la protéine ZEBRA allant de l'acide aminé en position 178 à l'acide aminé en position 220 est connu et sera appelé MD11 dans la suite de la présente description. Il s'agit d'un peptide de pénétration cellulaire (CPP pour « *cell-penetrating peptide* » en terminologie anglo-saxonne) aussi appelé « peptide de transport » ou encore « peptide transporteur » ou plus simplement « transporteur » ou « vecteur de transport » (« *Delivery system* » en terminologie anglo-saxonne).

[0012] A cet effet, selon un premier aspect, la présente invention vise un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8.

[0013] De tels peptides peuvent être qualifiés de peptides transporteurs et sont destinés à l'internalisation de molécules d'intérêt dans des cellules cibles. Ils ont pour avantage de bénéficier d'une capacité de pénétration cellulaire au moins équivalente ou supérieure à celle du peptide transport MD11. Ils sont par ailleurs présents dans les cellules même lorsqu'elles sont traitées avec de faibles concentrations de l'ordre du nanomolaire ce qui corrobore une pénétration directe et sans intermédiaire dans les cellules pour les molécules qu'ils peuvent transporter. Enfin, aucune toxicité des peptides seuls pour les cellules cibles n'a pu être mise en évidence.

[0014] On entend par capacité de pénétration cellulaire l'efficacité d'internalisation de

molécules d'intérêt, c'est à dire le pourcentage de cellules traitées contenant les molécules d'intérêt dans leur cytoplasme. Cette efficacité d'internalisation repose sur la détection des molécules d'intérêt dans les cellules transduites au moyen, par exemple, de la microscopie ou de la cytométrie en flux ou toutes autres techniques d'imagerie permettant de visualiser l'internalisation au niveau moléculaire, par exemple le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET pour « *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* » en terminologie anglo-saxonne), le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET pour « *Förster Resonance Energy Transfer* » en terminologie anglo-saxonne, la microscopie électronique, la microscopie à force atomique (AFM pour « *Atomic Force Microscopy* » en terminologie anglo-saxonne), l'optogénétique,....

- [0015] L'expression « transporteur » désigne une molécule capable de transporter et de transférer une autre molécule différente à travers la membrane plasmique pour lui permettre de pénétrer dans la cellule.
- [0016] L'expression « l'internalisation d'une molécule d'intérêt dans les cellules cibles » désigne le passage d'une molécule d'intérêt de l'extérieur d'une cellule cible à l'intérieur de celle-ci.
- [0017] Selon un deuxième aspect la présente invention vise une molécule d'acide nucléique codant un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8.
- [0018] Les séquences d'acides nucléiques codant les peptides représentés par les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 tels que décrit ci-dessus peuvent être déduites à partir de ces séquences d'acides aminés selon le principe de la dégénérescence du code génétique connu de l'homme du métier.
- [0019] Selon un troisième aspect la présente invention vise un vecteur d'expression comprenant une molécule d'acide nucléique codant un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8. Un tel vecteur d'expression peut être de tout type connu en lui-même pour une mise en œuvre en ingénierie génétique, notamment un plasmide, un cosmide, un virus, un bactériophage, contenant les éléments nécessaires pour la transcription et la traduction de la séquence codant le peptide selon l'invention.
- [0020] Selon un mode de réalisation particulier de la présente invention, le vecteur comporte en outre les éléments de génie génétique, en particulier les origines de répllication et les promoteurs, permettant de contrôler la répllication autonome du vecteur dans l'organisme hôte et l'expression spécifique des peptides tels que décrits ci-dessus.

- [0021] Selon un quatrième aspect la présente invention vise une cellule hôte comprenant une molécule d'acide nucléique codant un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8, ou un vecteur d'expression comprenant une telle molécule d'acide nucléique. Les cellules hôtes peuvent être par exemple des cellules procaryotes telles que *E. coli* ou les *Bacillus*, ou des cellules eucaryotes telles que les levures notamment *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, les champignons filamenteux, notamment *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger*, les cellules d'insecte en utilisant les Baculovirus, ou des lignées cellulaires telles que CHO, HEK 293, Cos ou Per.C6.
- [0022] Selon un cinquième aspect la présente invention vise l'utilisation d'un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 ou d'une molécule d'acide nucléique codant pour un tel peptide ou d'un vecteur d'expression comprenant une telle molécule d'acide nucléique ou d'une cellule hôte comprenant une telle molécule d'acide nucléique ou un tel vecteur d'expression, pour l'obtention d'un transporteur destiné à l'internalisation d'une molécule d'intérêt dans des cellules cibles.
- [0023] Les cellules susceptibles d'être les cellules cibles d'un processus d'internalisation mis en œuvre par un transporteur objet de la présente invention sont de préférence choisies parmi des cellules eucaryotes, notamment des cellules humaines. Ces cellules humaines peuvent être des cellules tumorales, telles que des cellules de mélanomes, des cellules de cancer du sein, des cellules de glioblastomes, des cellules de cancer du côlon, des cellules de lymphomes. Ces cellules humaines peuvent être également des cellules normales incluant des fibroblastes, cellules épithéliales, lymphocytes, cellules dendritiques, cellules musculaires comme les myocytes, les myoblastes et les myotubes par exemple.... Ces cellules humaines peuvent être également des cellules somatiques différenciées qui seront amenées à la dédifférenciation pour former des cellules souches pluripotentes induites (CSPi). Pour cibler certaines lignées de cellules, des séquences peptidiques comme des peptides de guidage ou peptide de ciblage (respectivement « *homing peptides* » et « *target peptides* » en terminologie anglo-saxonne), des signaux de localisation nucléaire ou NLS (pour « *nuclear localization signal* » en terminologie anglo-saxonne), peuvent être greffées sur le transporteur selon l'invention.
- [0024] Selon un sixième aspect la présente invention vise une combinaison comprenant un transporteur et une molécule d'intérêt, ledit transporteur étant un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID

NO : 7 et SEQ ID NO : 8.

- [0025] Dans des modes de réalisation particulier de la présente invention la molécule d'intérêt est de préférence une molécule d'intérêt biotechnologique, diagnostique ou thérapeutique. Une telle molécule d'intérêt est de préférence choisie parmi polypeptide, ADN, ARN, oligonucléotides, siARN, shARN miARN, ARN antisens, ou des acides nucléiques peptidiques (ANP).
- [0026] Selon un septième aspect la présente invention vise une protéine de fusion comprenant un transporteur qui est un peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8, et une molécule d'intérêt qui est un polypeptide d'intérêt.
- [0027] Par « protéine de fusion », on entend un polypeptide recombinant ou synthétique contenant au moins deux peptides, issus de deux protéines différentes, l'un lié à l'autre directement par liaison peptidique, ou par un linker peptidique, par exemple GSGG. Le polypeptide d'intérêt peut être lié à la partie N-terminale ou C-terminale du transporteur.
- [0028] Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, la protéine de fusion comprend ou consiste en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 23 à SEQ ID NO : 29, SEQ ID NO : 31 à SEQ ID NO : 37, SEQ ID NO : 39 à SEQ ID NO : 45, SEQ ID NO : 47 à SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 55 à SEQ ID NO : 61.
- [0029] Selon un huitième aspect la présente invention vise une molécule d'acide nucléique codant pour la protéine de fusion objet de la présente invention.
- [0030] Selon un neuvième aspect la présente invention vise un vecteur d'expression comprenant une molécule d'acide nucléique codant pour la protéine de fusion objet de la présente invention. Un tel vecteur d'expression peut être de tout type connu en lui-même pour une mise en œuvre en ingénierie génétique, notamment un plasmide, un cosmide, un virus, un bactériophage, contenant les éléments nécessaires pour la transcription et la traduction de la séquence codant la protéine de fusion selon l'invention.
- [0031] Selon un mode de réalisation particulier de la présente invention, le vecteur comporte en outre les éléments de génie génétique, en particulier les origines de répllication et les promoteurs, permettant de contrôler la répllication autonome du vecteur dans l'organisme hôte et l'expression spécifique des protéines de fusion telles que décrites ci-dessus.
- [0032] Selon un dixième aspect la présente invention vise une cellule hôte comprenant une molécule d'acide nucléique codant pour la protéine de fusion objet de la présente invention ou un vecteur d'expression comprenant une telle molécule d'acide nucléique. Les cellules hôtes peuvent être par exemple des cellules procaryotes telles que *E. coli*

ou les *Bacillus*, ou des cellules eucaryotes telles que les levures notamment *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, les champignons filamenteux, notamment *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger*, les cellules d'insecte en utilisant les Baculovirus, ou des lignées cellulaires telles que CHO, HEK 293, Cos, Per.C6.

- [0033] Dans des modes de réalisation particulier de la combinaison ou de la protéine de fusion objet de la présente invention, la molécule d'intérêt est liée au transporteur par une liaison covalente ou non covalente, telle qu'une liaison ionique, une liaison hydrogène, ou une liaison hydrophobique. Lorsque la molécule d'intérêt est un polypeptide d'intérêt, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le polypeptide d'intérêt est lié au transporteur selon l'invention par une liaison peptidique directe.
- [0034] Selon un onzième aspect la présente invention vise une composition pharmaceutique comprenant une combinaison ou une protéine de fusion objet de la présente invention. De préférence, la composition comprend un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Le choix d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable est connu de l'homme du métier.
- [0035] Selon un douzième aspect la présente invention vise la combinaison ou la protéine de fusion ou la composition pharmaceutique objet de la présente invention pour son utilisation dans le traitement, le diagnostic ou la prévention des cancers tels que mélanomes, cancer du sein, tumeurs du cerveau, glioblastomes, cancer du côlon, lymphomes.
- [0036] Pour n'importe lequel des aspects de l'invention cités ci-avant, selon des modes de réalisations particuliers de l'invention, la molécule d'intérêt comprend ou consiste en un polypeptide d'intérêt choisi parmi un polypeptide codant la protéine eGFP représenté par la séquence SEQ ID NO : 17, un polypeptide codant la protéine eIF3f représenté par la séquence SEQ ID NO : 18, un polypeptide codant la protéine FERM représenté par la séquence SEQ ID NO : 19, un polypeptide codant tout ou partie de la protéine MDA-7 représenté respectivement par les séquences SEQ ID NO : 20 (protéine MDA-7 entière) et SEQ ID NO : 21 (protéine MDA-7 tronquée) et un polypeptide représenté par une séquence ayant 80%, notamment 90%, particulièrement 95% d'identité de séquence avec l'une des séquences SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 21.
- [0037] Le pourcentage d'identité de séquences de peptides est déterminé par comparaison directe de deux séquences de molécules polypeptidiques, en déterminant le nombre de résidus d'acides aminés identiques dans les deux séquences, puis en le divisant par le nombre de résidus d'acides aminés de la séquence la plus longue des deux, et en multipliant le résultat par 100.
- [0038] Les séquences d'acides nucléiques codant les polypeptides représentés par les

séquences SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 21 tels que décrit ci-dessus peuvent être déduites à partir de ces séquences d'acides aminés des peptides selon le principe de la dégénérescence du code génétique connu de l'homme du métier.

### **Brève description des figures**

- [0039] L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante, donnée à titre d'exemple nullement limitatif, et faite en se référant aux figures qui représentent :
- [0040] [Fig.1] la [Fig.1] illustre un histogramme présentant les pourcentages de cellules HEK et B16-Ova fluorescentes après traitement avec des protéines de fusion fluorescentes objet de la présente invention ;
- [0041] [Fig.2] la [Fig.2] illustre des images de cellules HEK et B16-Ova observées au microscope à fluorescence après traitement avec des protéines de fusion fluorescentes objet de la présente invention ;
- [0042] [Fig.3] la [Fig.3] illustre des courbes de viabilité des cellules B16-Ova et HEK en fonction de la dose de traitement après 24h et 48h permettant de calculer l'IC50 des protéines de fusion potentiellement thérapeutiques objet de la présente invention.

### **Description des modes de réalisation**

- [0043] Dans la suite de la description, les séquences d'acides nucléiques codant les peptides et polypeptides représentés par les séquences d'acides aminés telles que décrites ci-après, peuvent être déduites à partir de ces séquences d'acides aminés selon le principe de la dégénérescence du code génétique connu de l'homme du métier.
- [0044] *Réalisation des plasmides MDmut et MD11*
- [0045] A partir de la séquence originale du peptide de pénétration cellulaire (CPP) MD11, les inventeurs ont créé 7 modifications de séquence numérotées de #2 à #8 selon l'éloignement par rapport à la séquence d'origine :
- SEQ ID NO : 2 appelée MDmut1DelCys qui correspond à la séquence KRYKNRVASRKRKAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLK,
  - SEQ ID NO : 3 appelée MDmut2 qui correspond à la séquence RREKNRVAARKCRAKFKNLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLK,
  - SEQ ID NO : 4 appelée MDmut2DelCys qui correspond à la séquence RREKNRVAARKRAKFKNLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLK,
  - SEQ ID NO : 5 appelée MDmut3 qui correspond à la séquence KRYKNRVASRKRKAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL,
  - SEQ ID NO : 6 appelée MDmut3DelCys qui correspond à la séquence KRYKNRVASRKRKAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL,
  - SEQ ID NO : 7 appelée MDmut4 qui correspond à la séquence RREKNRVAARKCRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL,

- SEQ ID NO : 8 appelée MDmut4DelCys qui correspond à la séquence RREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL.
- [0046] Les fragments d'ADN codant chaque CPP mutant *MDmut* sont obtenus par PCR et insérés dans le vecteur d'expression pET15b qui permet d'exprimer dans des bactéries, les peptides dont l'extrémité N-terminale est liée à une étiquette de 6-histidine, tous les plasmides étant construits selon la même organisation d'éléments de génie génétiques entourant la séquence du CPP.
- [0047] La séquence de MD11 numérotée #1 et correspondant à la séquence KRYKNR-VASRKCRKAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKQ (SEQ ID NO : 1) est également insérée dans un plasmide d'expression pET\_15b comprenant la même organisation d'éléments de génie génétique que les plasmides comprenant les mutants MDmut.
- [0048] L'organisation des éléments de génie génétique est la suivante dans chaque plasmide d'expression dans le sens 5' vers 3' :
- [0049] NdeI Res Site – His Tag – TEV seq – site de clivage MMP2 – MD Seq – XhoI Res Site
- [0050] dans laquelle :
- [0051] NdeI Res Site = site de restriction NdeI
- [0052] His Tag = étiquette polyhistidine
- [0053] TEV seq = séquence de clivage de la protéase Tev
- [0054] Site de clivage MMP2 = séquence de clivage par la métalloprotéase 2 (ciblage des tumeurs)
- [0055] MD Seq = la séquence MD11 ou MDmut
- [0056] XhoI Res Site = site de restriction XhoI
- [0057] Les plasmides ont tous été vérifiés par séquençage en double sens au niveau de la séquence d'insertion des éléments génétiques codant pour les protéines de fusion d'intérêt.
- [0058] Avec cette organisation des éléments de génie génétique on obtient ainsi les séquences suivantes de peptides de pénétration cellulaire (CPP) :
- SEQ ID NO : 9 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKCRKAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKQ pour le CPP comprenant la séquence MD11,
  - SEQ ID NO : 10 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLK pour le CPP comprenant la séquence MDmut1DelCys,
  - SEQ ID NO : 11 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPRREKNRVAARKCRKAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLK pour le CPP comprenant la séquence Mdmu2,

- SEQ ID NO : 12 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQSGALGLPRREKNRVAARKRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL K pour le CPP comprenant la séquence Mdmut2DelCys,
- SEQ ID NO : 13 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQSGALGLPKRYKNRVASRKCRKAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL pour le CPP comprenant la séquence Mdmut3,
- SEQ ID NO : 14 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQSGALGLPKRYKNRVASRKRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL pour le CPP comprenant la séquence Mdmut3DelCys,
- SEQ ID NO : 15 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQSGALGLPRREKNRVAARKCRKAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL pour le CPP comprenant la séquence Mdmut4,
- SEQ ID NO : 16 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQSGALGLPRREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQL pour le CPP comprenant la séquence Mdmut4DelCys.

[0059] *Réalisation des plasmides des polypeptides d'intérêt*

[0060] Pour l'obtention des séquences des molécules d'intérêt rapportrices, ici des polypeptides des protéines eGFP (pour « *enhanced green fluorescent protein* » en terminologie anglo-saxonne) à usage biotechnologique et eIF3f (pour « *eukaryotic Translation Initiation Factor 3 subunit F* » en terminologie anglo-saxonne), FERM (correspondant au domaine FERM) et MDA-7 (pour « *Melanoma Differentiation Associated 7* » en terminologie anglo-saxonne) entière ou tronquée, aussi connue sous le nom IL-24, à usage thérapeutique, à mettre en fusion de nos CPP-mutants Mdmut, 5 plasmides, dits donneurs, contenant les inserts d'intérêt dont les séquences des polypeptides d'intérêt sont les suivantes ont été utilisés :

- SEQ ID NO : 17 correspondant au polypeptide MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK de la protéine eGFP,
- SEQ ID NO : 18 correspondant au polypeptide ATPAVPVSAPPATPTPV-PAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAAPASSSDPAAAAAATAAPGQTPAS AQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRVVRLHPVILASIVDSYERRNEGARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFSPHNESEDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIHEYYSREAPNPIHLTVDTSLQNG

RMSIKAYVSTLMGVPGRTMGVMFTPLTVKYAYYDTERIGVDLIMKTC  
 FSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDALSTVLQYAEDVLSGKVSADNTV  
 GRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNSNINDLLMVTYLANLTQSQUALNE  
 KLVNL de la protéine eIF3f,

- SEQ ID NO : 19 correspondant au polypeptide MPKPINVRVTTMDAELE-  
 FAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVWYFGLHYVDNKGFPWLKLDKK  
 VSAQEVKRNPLQFKFRAKFYPEDVAEELIQDITQKLFLLQVKEGILSD  
 EIYCPPETAVLLGSYAVQAKFGDYNKEVHKSGYLSSELRIPQRVMDQ  
 HKLTRDQWEDRIQVWHAHRGMLKDNAMLEYLKIAQDLEMYGINY  
 FEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDDKLTTPKIGFPWSEIRNISFNDK  
 KFVIKPIDKKAPDFVFYAPRLRINKRILQLCMGNHELYMRRRKPDITIEV  
 QQMKAQAREEKHQKQLER de la protéine FERM,
- SEQ ID NO : 20 correspondant au polypeptide NFQQLQSLWTLARPFCP-  
 PLLATASQMVMVLPCLGFTLLLWSQVSGAQQEFHFGPCQVKGVV  
 PQKLWEAFWAVKDTMQAQDNNTSCRLQEQGLQNVSDAESCYL VH  
 TLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSSTLANNFVLIVSQLQPSQENE  
 MFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFYK  
 L de la protéine MDA-7,
- SEQ ID NO : 21 correspondant au polypeptide GQEFHFGPCQVKGVVP-  
 QKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAESCYL VHTL  
 LEFYLKTVFKNHHNRTVEVRTLKSFSSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMF  
 SIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFYKL de  
 la protéine MDA-7 tronquée.

[0061] Les inventeurs disposent de ces séquences (SEQ ID NO : 17 à SEQ ID NO : 21) flanquées des sites de restriction XhoI et BamHI dans un plasmide pET15b. Elles ont été préalablement séquencées grâce au primer commercial pET\_RP et leur profil de restriction a également été analysé par digestions simples et doubles afin de s'assurer de la possibilité de les extraire sans impacter la séquence qui devra être traduite.

[0062] *Création de la banque de plasmides*

[0063] Tout d'abord, les 8 plasmides Mdmut et les 5 plasmides donneurs des polypeptides d'intérêt ont été transformés dans des bactéries *E. coli* XL10 Gold. Pour cela, 25µl de bactéries ont été transformées avec 50 ng de plasmides par choc thermique 30 min dans la glace puis 40 sec à 42°C avant un passage dans la glace. Cette étape a été suivie d'une mise en culture liquide dans 100µL de milieu de culture SOC à 37°C pendant 1h puis d'un étalement sur boîte de Pétri contenant du milieu LB (Lysogeny Broth) – Agar – Ampicilline et d'une incubation à 37°C sur la nuit. Le lendemain, une colonie isolée a étéensemencée dans 5 ml de milieu LB-Ampicilline et incubée à 37°C – 150 rpm sur la nuit. 2 ml de culture ont ensuite été centrifugés à 11000g et les

plasmides ont été purifiés et élués dans 25µL d'eau grâce au kit Miniprep de Macherey Nagel selon le protocole du fabricant.

- [0064] Les plasmides ainsi obtenus ont été préparés en vue du sous-clonage après double digestion par les enzymes de restriction XhoI et BamHI 2 µg de plasmide ont donc été digérés par 5 unités de chaque enzyme de restriction pendant 3h à 37°C. La migration des produits de digestion dans un gel d'agarose 0.6% - TAE 0.5X - Gel Red 1X pendant 1h30 à 75V a été suivi d'une purification des bandes d'intérêt grâce au kit PCR and Gel clean Up de Macherey Nagel selon le protocole du fabricant.
- [0065] Les plasmides MDmut et MD11, qu'on peut qualifier de receveurs, ont donné leur squelette contenant les séquences CPP-mutants ou MD11 et les plasmides comprenant les polypeptides d'intérêt, qualifiés de donneurs, ont donné leur insert contenant la séquence des polypeptides d'intérêt.
- [0066] Les inserts correspondant aux polypeptides d'intérêt ont pu être sous-clonés dans chacun des 8 plasmides MDmut, créant ainsi une nouvelle banque de 40 plasmides recombinants permettant la synthèse des protéines de fusion. Pour cela, une ligation a été effectuée avec 3 fold molaire de chaque insert de polypeptides d'intérêt et 50 ng de plasmide mutant grâce à une T4 ADN ligase en 10 min à 22°C. Cette étape a été suivie de la transformation de 25µL de bactéries XL10 Gold avec la moitié du produit de ligation selon le même protocole que précédemment cité.
- [0067] Les colonies transformées par les plasmides recombinants ont été pré-sélectionnées grâce à des PCR sur colonie. Pour réaliser cela, une enzyme commerciale au 2X prête à l'emploi a été utilisée en y diluant de moitié 10 µM d'amorces sens et antisens dans de l'eau stérile. Un piquage au cône de toutes les colonies de la boîte a été effectué afin de contaminer 20 µl de mix PCR avant lancement du thermocycleur selon un programme adapté aux amorces (Lid = 110°C ; 1 : 3min – 94° ; 2 : 30 sec – 94° ; 3 : 30 sec – 60°C ; 4 : 1 min – 72°C ; 5 : GOTO 2 x 25 repeats ; 6 : 5min – 72°C ; 7 : Hold – 16°C). Par la suite la migration des produits PCR dans un gel d'agarose 1.5% - TAE 0.5X – Gel Red 1X pendant 40 min à 100V a été effectuée.
- [0068] Après migration des produits PCR sur gel d'agarose, les échantillons issus des piquages de colonie ont été comparés aux échantillons contrôle positif (plasmide donneur) ou contrôle négatif (Eau). Une ou deux colonies ayant donné un amplicon de taille et d'aspect comparable au contrôle positif, ont ensuite été mises en culture afin d'amplifier et de purifier par l'utilisation d'un kit commercial « miniprep » les plasmides pour les envoyer au séquençage en double sens (amorces T7 et pET\_RP) pour vérification de l'alignement de leur séquence par rapport à la séquence théorique.
- [0069] De nouvelles bactéries E. coli XL10 Gold ont ensuite été retransformées à partir des échantillons plasmidiques validés en séquençage. Cette nouvelle transformation a permis la constitution d'un stock glycérol (congélation à -80°C de 750µl de culture sur

la nuit de bactéries XL10 avec 25% de glycérol stérile) et d'un stock de plasmides recombinants concentrés, et purifiés par l'utilisation du kit « midiprep » Macherey Nagel selon le protocole du fabricant.

- [0070] Dans chaque plasmide recombinant l'organisation des éléments de génie génétique est la suivante dans le sens 5' vers 3' :
- [0071] NdeI Res Site – His Tag – TEV seq – site de clivage MMP2 – MD Seq - XhoI – PolyPep - BamHI
- [0072] dans laquelle :
- [0073] NdeI Res Site = site de restriction NdeI
- [0074] His Tag = étiquette polyhistidine
- [0075] TEV seq = séquence de clivage de la protéase Tev
- [0076] Site de clivage MMP2 = séquence de clivage par la métalloprotéase 2 (ciblage des tumeurs)
- [0077] MD Seq = la séquence MD11 (SEQ ID NO : 1) ou une séquence MDmut (SEQ ID NO : 2 à SEQ ID NO : 8)
- [0078] XhoI = site de restriction XhoI
- [0079] PolyPep = la séquence du polypeptide d'intérêt (SEQ ID NO : 17 à SEQ ID NO : 21)
- [0080] BamHI = site de restriction BamHI
- [0081] On obtient ainsi les séquences suivantes de protéines de fusion codées par les plasmides recombinants ainsi créés :
- SEQ ID NO : 22 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLL LKQLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAM PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL GMDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 9) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MD11, en fusion avec la protéine eGFP (SEQ ID NO : 17).
  - SEQ ID NO : 23 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKRKAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLL KLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILG HKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQ NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLG MDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 10) comprenant les éléments de génie

- génétiq ue et la séquence MDmut1DelCys en fusion avec la protéine eGFP ( SEQ ID NO : 17).
- SEQ ID NO : 24 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS- GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL LKLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL GMDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 11) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2 en fusion avec la protéine eGFP (SEQ ID NO : 17).
  - SEQ ID NO : 25 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS- GALGLPRREKNRVAARKKRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLL KLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILG HKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQ NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLG MDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 12) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2DelCys en fusion avec la protéine eGFP (SEQ ID NO : 17).
  - SEQ ID NO : 26 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS- GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK LEQLLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSA MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGN ILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHY QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGIT LGMDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 13) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3 en fusion avec la protéine eGFP (SEQ ID NO : 17).
  - SEQ ID NO : 27 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS- GALGLPKRYKNRVASRKRKRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL EQLLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAM PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ

- QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL  
GMDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 14) comprenant les éléments de génie  
génétique et la séquence MDmut3DelCys en fusion avec la protéine eGFP  
(SEQ ID NO : 17).
- SEQ ID NO : 28 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK  
LEQLLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG  
KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSA  
MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGN  
ILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHY  
QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGIT  
LGMDLYK pour le CPP (SEQ ID NO : 15) comprenant les éléments de  
génie génétique et la séquence MDmut4 en fusion avec la protéine eGFP  
(SEQ ID NO : 17).
  - SEQ ID NO : 29 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL  
EQLLEMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGGK  
LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAM  
PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI  
LGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ  
QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL  
GMDELYK pour le CPP (SEQ ID NO : 16) comprenant les éléments de génie  
génétique et la séquence MDmut4DelCys en fusion avec la protéine eGFP  
(SEQ ID NO : 17).
  - SEQ ID NO : 30 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLL  
LKQLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTAPAAAAPVPAAPAA  
SSSDPAAAAATAAPGQTPASQAQAPQTPAPALPGPALPGPFPGGRVV  
RLHPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFVPHN  
ESEDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIH  
EYYSREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKA YVSTLMGVPGRTMGVMFTP  
LTVKYA YYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDA  
LSTVLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNS  
NINDLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO : 9)  
comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MD11 en fusion  
avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).
  - SEQ ID NO : 31 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLL

KLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAPASSS  
 DPAAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRVVRL  
 HPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFSVPHNESE  
 DEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIHEY  
 SREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKA YVSTLMGVPGRTMGVMFTPLTV  
 KYAYYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDALST  
 VLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNSNIN  
 DLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO : 10)

comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut1DelCys  
 en fusion avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).

- SEQ ID NO : 32 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLL  
 LKLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAPASS  
 SDPAAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRVVR  
 LHPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFSVPHNES  
 EDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIHEY  
 YSREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKA YVSTLMGVPGRTMGVMFTPLT  
 VKYAYYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDALS  
 TVLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNSNI  
 NDLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO : 11)  
 comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2 en fusion  
 avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).

- SEQ ID NO : 33 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL  
 KLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAPASSS  
 DPAAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRVVRL  
 HPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFSVPHNESE  
 DEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIHEY  
 SREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKA YVSTLMGVPGRTMGVMFTPLTV  
 KYAYYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDALST  
 VLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNSNIN  
 DLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO : 12)  
 comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2DelCys  
 en fusion avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).

- SEQ ID NO : 34 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK  
 LEQLLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAP  
 ASSSDPAAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRV

VRLHPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFVPH  
 NESEDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLI  
 HEYYSREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKAYVSTLMGVPGRTMGVMFT  
 PLTVKYAAYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQD  
 ALSTVLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLN  
 SNINDLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO :  
 13) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3 en  
 fusion avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).

- SEQ ID NO : 35 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPKRYKNRVASRKRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL  
 EQLLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAPA  
 SSSDPAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRVV  
 RLHPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFVPHN  
 ESEDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIH  
 EYYSREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKAYVSTLMGVPGRTMGVMFTP  
 LTVKYAAYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDA  
 LSTVLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNS  
 NINDLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO : 14)  
 comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3DelCys  
 en fusion avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).
- SEQ ID NO : 36 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK  
 LEQLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAP  
 ASSSDPAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRV  
 VRLHPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFVPH  
 NESEDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLI  
 HEYYSREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKAYVSTLMGVPGRTMGVMFT  
 PLTVKYAAYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQD  
 ALSTVLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLN  
 SNINDLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO :  
 15) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut4 en  
 fusion avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).
- SEQ ID NO : 37 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL  
 EQLLEATPAVPVSAPPATPTVPAAAPASVPAPTPAPAAAPVPAAPA  
 SSSDPAAAAATAAPGQTPASAQAPAQTPAPALPGPALPGPFPGGRVV  
 RLHPVILASIVDSYERRNEGAARVIGTLLGTVDKHSVEVTNCFVPHN  
 ESEDEVAVDMEFAKNMYELHKKVSPNELILGWYATGHDITEHSVLIH

EYYSREAPNPIHLTVDTSLQNGRMSIKAYVSTLMGVPGRTMGVMFTP  
LTVKYAYYDTERIGVDLIMKTCFSPNRVIGLSSDLQQVGGASARIQDA  
LSTVLQYAEDVLSGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIVPDDFETMLNS  
NINDLLMVTYLANLTQSQIALNEKLVNL pour le CPP (SEQ ID NO : 16)  
comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut4DelCys  
en fusion avec la protéine eIF3f ( SEQ ID NO : 18).

- SEQ ID NO : 38 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRL  
LKQLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVWY  
FGLHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDVA  
EELIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETAVLLGSYAVQAKFGDYNK  
EVHKSGLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLKD  
NAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDD  
KLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVFYAPRLRINKRILQL  
CMGNHELYMRRRKPDITIEVQQMKAQAREEKHKQQLER pour le CPP  
(SEQ ID NO : 9) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence  
MD11 en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
- SEQ ID NO : 39 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKRKAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRL  
KLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVWYFG  
LHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDVAEE  
LIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETAVLLGSYAVQAKFGDYNKEV  
HKSGYLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLKD  
NAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDD  
KLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVFYAPRLRINKRILQLC  
MGNHELYMRRRKPDITIEVQQMKAQAREEKHKQQLER pour le CPP  
(SEQ ID NO : 10) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence  
MDmut1DelCys en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
- SEQ ID NO : 40 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNLLQHYREVAAAKSSSENDRLRL  
LKLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVWYF  
GLHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDVAE  
ELIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETAVLLGSYAVQAKFGDYNKE  
VHKSGLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLKDN  
AMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDD  
KLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVFYAPRLRINKRILQLC  
MGNHELYMRRRKPDITIEVQQMKAQAREEKHKQQLER pour le CPP  
(SEQ ID NO : 11) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence

- MDmut2 en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
- SEQ ID NO : 41 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL KLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVWYFG LHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDVAEE LIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETA VLLGSYAVQAKFGDYNKEV HKSGYLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLKDNA MLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDDKL TPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVIFYAPRLRINKRILQLC MGNHELYMRRRKPDTIEVQQMKAQAREEKHQKQLER pour le CPP (SEQ ID NO : 12) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2DelCys en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
  - SEQ ID NO : 42 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK LEQLLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVW YFGLHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDV AEELIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETA VLLGSYAVQAKFGDYN KEVHKSGYLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLK DNAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDDKLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVIFYAPRLRINKRIL QLCMGNHELYMRRRKPDTIEVQQMKAQAREEKHQKQLER pour le CPP (SEQ ID NO : 13) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3 en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
  - SEQ ID NO : 43 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVWY FGLHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDVA EELIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETA VLLGSYAVQAKFGDYNK EVHKSGYLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLKD NAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDD KLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVIFYAPRLRINKRILQL CMGNHELYMRRRKPDTIEVQQMKAQAREEKHQKQLER pour le CPP (SEQ ID NO : 14) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3DelCys en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
  - SEQ ID NO : 44 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK LEQLLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVW YFGLHYVDNKGFPWLKLDKKVSAQEVVRKENPLQFKFRAKFYPEDV

AEELIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETAVLLGSYAVQAKFGDYN  
KEVHKSGLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLK  
DNAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKD  
DKLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVIFYAPRLRINKRIL  
QLCMGNHELYMRRRKPDITIEVQQMKAQAREEKHQKQLER pour le  
CPP (SEQ ID NO :15) comprenant les éléments de génie génétique et la  
séquence MDmut4 en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).

- SEQ ID NO : 45 qui correspond à la séquence MMHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL  
EQLLEPKPINVRVTTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKITIGLREVWY  
FGLHYVDNKGFPWTLKLDKKVSAQEVRKENPLQFKFRAKFYPEDVA  
EELIQDITQKLFFLQVKEGILSDEIYCPPETAVLLGSYAVQAKFGDYNK  
EVHKSGLSSERLIPQRVMDQHKLTRDQWEDRIQVWHAEHRGMLKD  
NAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDALGLNIYEKDD  
KLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVIFYAPRLRINKRILQL  
CMGNHELYMRRRKPDITIEVQQMKAQAREEKHQKQLER pour le CPP  
(SEQ ID NO : 16) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence  
MDmut4DelCys en fusion avec la protéine FERM (SEQ ID NO : 19).
- SEQ ID NO : 46 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLL  
LKQLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMVMVLPCLGFTLLLW  
SQVSGAQQQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQNNTS  
CRLQEQGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLK  
SFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEA  
ALTKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 9)  
comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MD11 en fusion  
avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).
- SEQ ID NO : 47 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLL  
KLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMVMVLPCLGFTLLLWSQ  
VSGAQQQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQNNTSCR  
LLQEQGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSF  
STLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL  
TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 10) comprenant  
les éléments de génie génétique et la séquence MDmut1DelCys en fusion  
avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).
- SEQ ID NO : 48 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLL

LKLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLLWS  
 QVSGAQQQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNNTSC  
 RLLQQEGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKS  
 FSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAA  
 LTKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 11)

comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2 en fusion avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).

- SEQ ID NO : 49 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNLLQHYREVAAAKSENDRLLRLLL  
 KLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLLWSQ  
 VSGAQQQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNNTSCR  
 LLQQEGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSF  
 STLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL  
 TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 12) comprenant  
 les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2DelCys en fusion  
 avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).

- SEQ ID NO : 50 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPKRYKNRVASRKCRKAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK  
 LEQLLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLL  
 WSQVSGAQQQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNN  
 TSCRLLQQEGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRT  
 LKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDV  
 EAALTKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 13)  
 comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3 en fusion  
 avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).

- SEQ ID NO : 51 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPKRYKNRVASRKCRKAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL  
 EQLLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLLW  
 SQVSGAQQQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNNTS  
 CRLLQQEGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLK  
 SFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEA  
 ALTKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 14)  
 comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3DelCys  
 en fusion avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).

- SEQ ID NO : 52 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
 GALGLPRREKNRVAARKCRKAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK  
 LEQLLENFQQRLQSLWTLARPFPCPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLL  
 WSQVSGAQQQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNN

TSCRLLQQEGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLYLKTVMFKNYHNRTVEVRT  
LKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDV  
EAALTKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 15)

comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut4 en fusion avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).

- SEQ ID NO : 53 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL  
EQLLENFQQRLQSLWTLARPCPPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLW  
SQVSGAQQQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNNTS  
CRLQEQEGLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLYLKTVMFKNYHNRTVEVRTLK  
SFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEA  
ALTKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 16)  
comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut4DelCys  
en fusion avec la protéine MDA-7 (SEQ ID NO : 20).
- SEQ ID NO : 54 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLL  
LKQLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARL  
LQEVQLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLYLKTVMFKNHHNRTVEVRTLKSFS  
TLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL  
TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 9) comprenant  
les éléments de génie génétique et la séquence MD11 en fusion avec la  
protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).
- SEQ ID NO : 55 qui correspond à la séquence MMHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLL  
KLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQ  
QEVQLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLYLKTVMFKNHHNRTVEVRTLKSFSTL  
ANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTK  
ALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 10) comprenant les  
éléments de génie génétique et la séquence MDmut1DelCys en fusion avec la  
protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).
- SEQ ID NO : 56 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-  
GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLL  
LKLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLL  
QQEVQLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLYLKTVMFKNHHNRTVEVRTLKSFST  
LANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALT  
KALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 11) comprenant  
les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2 en fusion avec la  
protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).

- SEQ ID NO : 57 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL KLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQ QEVLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNHHNRTVEVRTLKSFSTL ANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTK ALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 12) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut2DelCys en fusion avec la protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).
- SEQ ID NO : 58 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK LEQLLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSAR LLQQEVLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNHHNRTVEVRTLKSF STLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 13) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3 en fusion avec la protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).
- SEQ ID NO : 59 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPKRYKNRVASRKCRAKFKQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL EQLLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARL LQQEVLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNHHNRTVEVRTLKSFS TLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 14) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut3DelCys en fusion avec la protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).
- SEQ ID NO : 60 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPRREKNRVAARKCRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHK LEQLLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSAR LLQQEVLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNHHNRTVEVRTLKSF STLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 15) comprenant les éléments de génie génétique et la séquence MDmut4 en fusion avec la protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).
- SEQ ID NO : 61 qui correspond à la séquence MHHHHHHHHENLYFQS-GALGLPRREKNRVAARKRAKFKNAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKL EQLLEGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARL LQQEVLQNVSDAESCYLEVHTLLEFYLKTVFKNHHNRTVEVRTLKSFS TLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAAL TKALGEVDILLTWMQKFYKL pour le CPP (SEQ ID NO : 16) comprenant

les éléments de génie génétique et la séquence MDmut4DelCys en fusion avec la protéine MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 21).

[0082] *Protocoles de production et purification des protéines de fusion*

[0083] Les protocoles ci-après ont été mis au point par la technique « d'essais-erreur » sur chacun des paramètres suivants :

- Production : souche bactérienne de *E. coli*, temps, température, volume de culture, condition de stress (addition éthanol à 1, 3 ou 5%), densité optique d'induction de la production, concentration en inducteur de la production (IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) ;
- Lyse : méthode chimique et/ou mécanique, temps, puissance, répétition ;
- Purification : solubilisation ou non, tampon, affinité, pureté, type de colonne, conditions de renaturation, dialyse.

[0084] *Production des protéines de fusion comprenant un CPP et le polypeptide eGFP*

[0085] Les conditions optimales de production et purification des protéines de fusion comprenant un CPP mutant (MDmut) ou MD11 et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 22 à SEQ ID NO : 29) ont été définies telles que décrites ci-après.

[0086] Le meilleur rendement de production a été observé après culture de bactéries *E. coli* BL21(DE3) transformées par les plasmides recombinants codant les séquences SEQ ID NO : 22 à SEQ ID NO : 29 sur la nuit à 16°C après induction de la production avec 0,5 mM d'IPTG ajouté à  $DO_{260}=1$ .

[0087] La lyse des bactéries a été optimale en 2 temps dans un tampon Tris – NaCl – imidazole. Tout d'abord, une lyse chimique au lysozyme à 1mg/ml pendant 30 min sur une roue pour une agitation douce a été réalisée à 4°C afin de préserver l'intégrité des protéines. Puis une lyse mécanique par 6 cycles de 30 sec de sonication d'abord 3 cycles à 30% de puissance puis 3 cycles à 70% de puissance a suivi, les lysats bactériens ayant été remis dans la glace au minimum 30 sec entre chaque sonication.

[0088] Après centrifugation, la fraction soluble a été passée sur colonne de Nickel et les protéines ont pu être éluées par compétition avec 500mM d'imidazole.

[0089] La pureté, la qualité et la quantité des protéines ont été analysées par SDS-PAGE et Western blot. Pour cela, 15  $\mu$ l d'échantillon sont mélangés à 5  $\mu$ L de tampon réducteur 4X et migrés dans un gel d'acrylamide à 12% pendant 1h à 30mA-150V. Les gels sont soit colorés au bleu de Coomassie pendant 2h à température ambiante (TA) sous agitation puis décolorés à l'eau, soit transférés sur une membrane de nitrocellulose 0.2  $\mu$ m par le système Bio-Rad Mini-protean selon le protocole du fabricant sur le programme poids moléculaire mixte ou « Mixed Molecular Weight » en terminologie anglo-saxonne. Les membranes ont ensuite été bloquées au lait écrémé 5% - TBS 1X tween 0.1% pendant 2h à TA sous agitation puis incubées avec un Anticorps anti-His HRP (pour « *HorseRadish Peroxidase* » en terminologie anglo-saxonne) dilué au

1/50000 dans la solution de blocage. L'anticorps anti-His se fixe sur l'étiquette poly-histidine des protéines de fusion et HRP permet sa détection au ChemiDoc Imaging System (BioRad) par chimioluminescence.

- [0090] La coloration au bleu de Coomassie des gels d'acrylamide nous a permis de constater que plus le rendement de production est important, moins la solubilisation des protéines est efficace. Cependant, les quantités de protéines solubilisées restent très importantes et suffisantes pour la purification de plusieurs milligrammes de protéines selon le protocole.
- [0091] Le western-blot, quant à lui, nous a indiqué la présence d'agrégats protéiques dans les échantillons qui ont pu être éliminés par l'addition d'une étape de centrifugation à très haute vitesse.
- [0092] *Production des protéines de fusion comprenant un CCP et le polypeptide eIF3f*
- [0093] Les conditions optimales de production et purification des protéines de fusion comprenant un CPP mutant (MDmut) ou MD11 et le polypeptide eIF3f (SEQ ID NO : 30 à SEQ ID NO : 37) sont définies ci-après.
- [0094] Le meilleur rendement de production a été observé après culture de bactéries E. coli BL21(DE3) transformées par les plasmides recombinants codant les séquences SEQ ID NO : 30 à SEQ ID NO : 37 sur la nuit à 16°C après induction de la production à 0,5 mM d'IPGT ajouté à DO=1.
- [0095] La lyse des bactéries a été optimale en 2 temps dans un tampon MOPS – NaCl – imidazole. Tout d'abord, une lyse chimique au lysozyme à 1mg/ml pendant 30 min sur une roue pour une agitation douce a été réalisée à 4°C afin de préserver l'intégrité des protéines. Puis une lyse mécanique par 5 cycles de 30 sec de sonication à 70% de puissance a suivi, les lysats bactériens ayant été remis dans la glace au minimum 30 sec entre chaque sonication.
- [0096] Aucun des protocoles testés n'a permis d'obtenir une quantité suffisante de protéines sous forme soluble. Après centrifugation, la fraction soluble a donc été éliminée et les corps d'inclusions ont été lavés dans 3 différents tampons de lavage (MOPS 20mM – NaCl 2M – Cystéine 15mM ; MOPS 20mM – NaCl 250mM – Cystéine 15mM – Tritton X100 2% ; MOPS 20mM – NaCl 250mM – Cystéine 15mM) puis solubilisés en condition dénaturante (MOPS 20mM – NaCl 250mM – Cystéine 15mM – Urée 8M). Les protéines ont été purifiées sur colonne de Nickel par compétition à l'imidazole (MOPS 20mM – NaCl 250mM – Cystéine 15mM – Urée 8M – Imidazole 500mM), les protéines ont été renaturées par la méthode de dilution au goutte à goutte (Na Citrate 50mM – MgCl<sub>2</sub> 2mM – DTT 2mM – NaCl 50mM – L-Argine 500mM – Tween 20 0,5%) puis dialysées en 2 temps (Na Citrate 50mM – MgCl<sub>2</sub> 2mM – DTT 2mM – NaCl 50mM – L-Argine 50mM – N-Lauryl Sarcosine 0,01% ; Na Citrate 50mM – NaCl 50mM – Glycérol 10%) pour être en solution dans un tampon

compatible avec les expériences in cellulo et in vivo.

- [0097] La pureté et la qualité des protéines ont été analysées par SDS-PAGE et Western blot avec le même protocole que celui utilisé pour les protéines de fusions comprenant la protéine eGFP et décrit dans la section précédente. Les échantillons de traitement ont quant à eux été dosés par la méthode microBCA selon le protocole du fabricant.
- [0098] Dans les échantillons d'éluion, de refolding et les dialysats une seule bande, marquée par l'anticorps anti-histidine en western blot, de 50kDa a été mise en évidence par la coloration du gel d'acrylamide au bleu de Coomassie. Les échantillons de traitement utilisés pour les expériences in vitro sont donc purs et de bonne qualité. En effet, l'absence de bande surnuméraire en Western blot a démontré l'absence de protéine dégradées et/ou agrégées dans les échantillons.
- [0099] *Production des protéines de fusion comprenant un CCP et le polypeptide MDA-7 ou MDA-7 tronquée*
- [0100] Les conditions optimales de production et purification des protéines de fusion comprenant un CPP mutant (MDmut) ou MD11 et le polypeptide MDA-7 (SEQ ID NO : 46 à SEQ ID NO : 53) ou le polypeptide de MDA-7 tronquée (SEQ ID NO : 54 à SEQ ID NO : 61) sont définies ci-après.
- [0101] Le meilleur rendement de production a été observé après culture de bactéries E. coli BL21(DE3) transformées par les plasmides recombinants codant les séquences SEQ ID NO : 46 à SEQ ID NO : 61 sur la nuit à 16°C après induction de la production avec 1M d'IPGT ajouté à  $DO_{260} > 1$ .
- [0102] La lyse des bactéries a été optimale en 2 temps dans un tampon Tris 50mM – NaCl 250 mM – imidazole 5 mM. Tout d'abord, une lyse chimique au lysozyme à 1mg/ml pendant 30 min sur une roue pour une agitation douce a été réalisée à 4°C afin de préserver l'intégrité des protéines. Puis une lyse mécanique par 5 cycles de 30 sec de sonication à 70% de puissance a suivi, les lysats bactériens ayant été remis dans la glace au minimum 30 sec entre chaque sonication.
- [0103] Aucun des protocoles testés n'a permis d'obtenir une concentration suffisante de protéines sous forme soluble. Après centrifugation, la fraction soluble a donc été éliminée et les corps d'inclusions ont été lavés dans 3 différents tampons de lavage (Tris 50 mM –  $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM – Tritton X100 2% ; Tris 20 mM –  $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM ; Tris 50 mM – DTT 20mM – Guanidine HydroChloride 6M) puis solubilisés en condition dénaturante de Guanidine. Les protéines ont été purifiées sur colonne de Nickel par compétition à l'imidazole (Tris 50 mM – Guanidine HydroChloride 6M - Imidazole 500mM) et renaturées par la méthode de dilution au goutte à goutte (Tris 50 mM – Guanidine HydroChloride 1,4M – NaCl 50mM – L-Argine 500mM – Tritton X100 0,5%) puis dialysées en 2 temps pour être en solution (Tris 50 mM – Guanidine HydroChloride 0,75M – NaCl 50mM – L-Argine 50mM – Tween20

0,5% ; Tris 50mM – NaCl 50 mM – Glycérol 10%) dans un tampon compatible avec les expériences in cellulo et in vivo.

- [0104] La pureté et la qualité des protéines ont été analysées par SDS-PAGE et Western blot puis ces dernières ont été dosées par la méthode microBCA. Une seule bande, marquée par l'anticorps anti-histidine en western blot, a été mise en évidence par la coloration du gel d'acrylamide au bleu de Coomassie. Les échantillons de protéines de fusion CPP couplé au polypeptides MDA7 entier ou tronqué sont donc purs et de bonne qualité. En effet, l'absence de bande surnuméraire en Western blot a démontré l'absence de protéine dégradées et/ou agrégées dans les échantillons.
- [0105] Analyse du potentiel de pénétration cellulaire des CPP
- [0106] Afin de démontrer le haut potentiel de pénétration intracellulaire des CPP mutants MDmut, des analyses de cytométrie en flux et en microscopie à fluorescence ont été réalisées.
- [0107] Les traitements par les protéines de fusion comprenant un CPP mutants et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 23 à SEQ ID NO : 29) ont été comparé au traitement par la eGFP seule, non lié à un transporteur, et aux traitements par les protéines de fusion comprenant soit le CPP MD11 (SEQ ID NO : 1) sans les éléments nouveaux de génie génétique et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 17), soit comprenant le CPP MD11 avec les nouveaux éléments de génie génétiques et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 22).
- [0108] Pour dénombrer le nombre de cellules fluorescentes après traitement, des cellules HEK293 et B16-Ova ont étéensemencées puis traitées à 60% de confluence environ par 200 nM de protéines de fusion respectives en l'absence de sérum bovin pendant 4h. Elles ont ensuite été supplémentées avec 5% de sérum bovin et incubées sur la nuit. Le lendemain les cellules ont été trypsinées puis lavées au PBS 1X et passées au FACS pour analyses.
- [0109] Un échantillon cellulaire non traité et supplémenté en Iodure de Propidium à 1µg/ml, a permis de calibrer le blanc et la plage de cellules vivantes. Pour les échantillons traités, un minimum de 25000 cellules vivantes a été analysé pour leur fluorescence verte.
- [0110] Les résultats d'analyse indiquent le pourcentage de cellules GFP positives après traitement et sont présentés en [Fig.1] dans laquelle :
- MD11-eGFP correspond à la protéine de fusion contrôle comprenant la séquence du CPP MD11 mais sans les éléments de génie génétique (SEQ ID NO : 1) et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 17) ;
  - #1A-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MD11 avec les éléments de génie génétique et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 22) ;

- #2B-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut1DelCys et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 23) ;
- #3C-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut2 et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 24) ;
- #4D-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut2DelCys et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 25) ;
- #5E-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut3 et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 26) ;
- #6F-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut3DelCys et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 27) ;
- #7G-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut4 et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 28) ;
- #8H-eGFP correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut4DelCys et le polypeptide eGFP (SEQ ID NO : 29).

[0111] La cytométrie en flux nous a montré que globalement, dans les conditions de traitements actuelles avec un nombre de répliques compris entre 3 et 5 par condition, le pouvoir de pénétration des protéines est plus important dans les cellules HEK293 que dans les cellules tumorales B16-Ova (B16). Pour les protéines de fusion MD11-eGFP et #5E-eGFP, nous sommes à la limite de la significativité  $p=0,057$ . Le même défaut de pénétration, par rapport à MD11-eGFP, est observé pour le mutant #4D-eGFP dans les deux lignées cellulaires.

[0112] Dans les cellules HEK293, les protéines de fusion comprenant un CPP mutant et le polypeptide eGFP ont une capacité de pénétration cellulaire préservée, dont une tendance non significative à la hausse pour #3C-eGFP, #5E-eGFP, #6F-eGFP et #7G-eGFP par rapport au contrôle (MD11-eGFP) avec un taux de cellules GFP-positives compris entre 73% et 82% contre 57%.

[0113] Dans les cellules B16-Ova (B16), la capacité de pénétration des mutants #3C-eGFP, #5E-eGFP, #6F-eGFP et #7G-eGFP est équivalente à celle de MD11-eGFP. En revanche la capacité de pénétration cellulaire des mutants #2B-eGFP, #4D-eGFP et #8H-eGFP est significativement plus faible entre 15% et 20% contre plus de 41%.

[0114] Par ailleurs, il est convenu que les protéines de fusion MD11-eGFP ou #1A-eGFP fournissent ici des résultats équivalents en tous points malgré le réarrangement d'éléments de génie génétique.

[0115] En parallèle, les mêmes cellules (HEK293 et B16-Ova) ont également étéensemencées sur des lames de verre équipées de chambres de culture puis traitées par les protéines de fusion MD11-eGFP, #1A-eGFP, #3C-eGFP, #5E-eGFP, #7G-eGFP ou le tampon pdt 4h en l'absence de sérum. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS 1X puis à l'héparine et fixées au Paraformaldéhyde et observées au microscope à fluo-

rescence. 5 plans focaux successifs espacés de 2µm ont été capturés afin de mettre en évidence la localisation intracellulaire des protéines.

[0116] Les images représentatives de la fluorescence des cellules après traitement sont données en [Fig.2].

[0117] L'efficacité de pénétration cellulaire des différents mutants étant inégale, certains signaux fluorescents ont dû être « forcés » pour être visibles mais tous ont été repérés comme intracellulaire. Cependant, les agrégats protéiques visualisés sur certaines images semblent quant à eux fixés aux membranes.

[0118] *Analyse du potentiel thérapeutique antitumoral de la protéine de fusion comprenant CPP et polypeptide de eIF3f*

[0119] Afin de démontrer le potentiel thérapeutique des CPP mutants MDmut fusionnés au facteur de régulation de la traduction eIF3f (SEQ ID NO : 31 à SEQ ID NO : 37) sur le mélanome, l'étude s'est poursuivie avec toujours les cellules HEK293 et B16-Ova.

[0120] La viabilité a été testée au Prestoblue®. Pour cela, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à bords noirs et fonds transparents puis, le lendemain, traitées à 60% de confluence à 0,25X de sérum de veau fœtal (SVF). Afin de calculer la concentration inhibitrice médiane (IC50) de chaque protéine de fusion, celles-ci ont été diluées selon une large gamme de concentration comprise entre 15 et 100 nM et incubées 24h ou 48h.

[0121] Les courbes de viabilité des cellules B16-Ova (B16) et HEK293 après 24h et 48h de traitement par les protéines de fusion sont illustrées en [Fig.3] dans laquelle :

- 1E correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MD11 et le polypeptide eIF3f (SEQ ID NO : 30) ;
- 3E correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut2 et le polypeptide eIF3f (SEQ ID NO : 32) ;
- 5E correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut3 et le polypeptide eIF3f (SEQ ID NO : 34) ;
- 7E correspond à la protéine de fusion comprenant la séquence du CPP MDmut4 et le polypeptide eIF3f (SEQ ID NO : 36).

[0122] Ces tests ont montré que le CPP mutant 3E s'avère le moins efficace tant sur les cellules B16 que HEK293 après 24 ou 48h. L'IC50 à 24h des autres CPP mutants est identique à environ 50 nM pour les cellules B16 et 30 nM pour les HEK293. L'IC50 à 48h n'est pas significativement différente non plus et située entre 25 et 35 nM, concentration extrêmement faible qui corrobore une action directe et sans intermédiaire des protéines de fusion dans les cellules.

[0123] De manière plus générale, il est à noter que les modes de mise en œuvre et de réalisation de l'invention considérés ci-dessus ont été décrits à titre d'exemples non limitatifs et que d'autres variantes sont par conséquent envisageables.

## Revendications

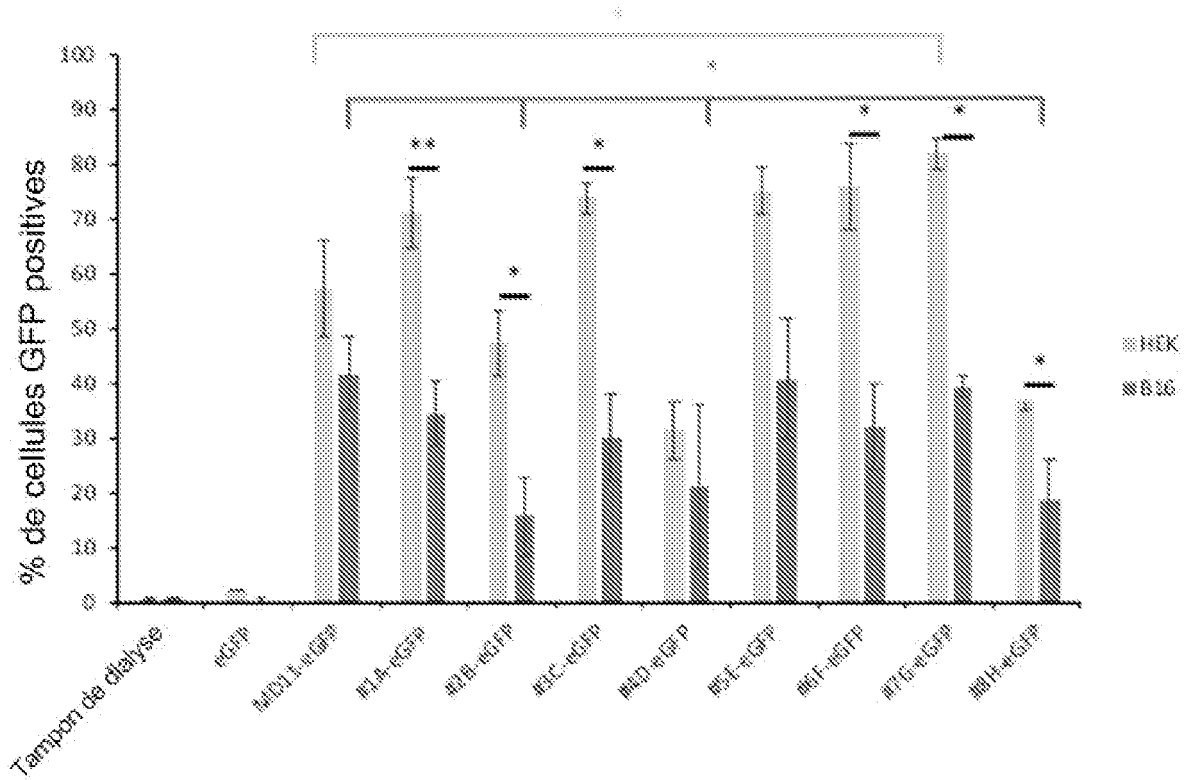
- [Revendication 1] Peptide comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8.
- [Revendication 2] Molécule d'acide nucléique codant un peptide selon la revendication 1.
- [Revendication 3] Vecteur d'expression comprenant une molécule d'acide nucléique codant un peptide selon la revendication 1.
- [Revendication 4] Cellule hôte comprenant une molécule d'acide nucléique selon la revendication 2 ou un vecteur d'expression selon la revendication 3.
- [Revendication 5] Utilisation d'un peptide selon la revendication 1 ou d'une molécule d'acide nucléique selon la revendication 2 ou d'un vecteur d'expression selon la revendication 3 ou d'une cellule hôte selon la revendication 4, pour l'obtention d'un transporteur destiné à l'internalisation d'une molécule d'intérêt dans des cellules cibles.
- [Revendication 6] Combinaison comprenant un transporteur et une molécule d'intérêt, ledit transporteur étant un peptide selon la revendication 1.
- [Revendication 7] Protéine de fusion comprenant un transporteur qui est un peptide selon la revendication 1, et une molécule d'intérêt qui est un polypeptide d'intérêt.
- [Revendication 8] Molécule d'acide nucléique codant pour la protéine de fusion selon la revendication 7.
- [Revendication 9] Vecteur d'expression comprenant une molécule d'acide nucléique codant pour la protéine de fusion selon la revendication 7.
- [Revendication 10] Cellule hôte comprenant une molécule d'acide nucléique selon la revendication 8 ou un vecteur d'expression selon la revendication 9.
- [Revendication 11] Composition pharmaceutique comprenant une combinaison selon la revendication 6 ou une protéine de fusion selon la revendication 7 ainsi qu'un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- [Revendication 12] Combinaison selon la revendication 6 ou protéine de fusion selon la revendication 7 ou composition pharmaceutique selon la revendication 11, pour son utilisation dans le traitement, le diagnostic ou la prévention de pathologies, notamment de cancers tels que mélanomes, cancer du sein, tumeurs du cerveau, glioblastomes, cancer du côlon, lymphomes.
- [Revendication 13] Combinaison selon la revendication 6, protéine de fusion selon la revendication 7, molécule d'acide nucléique selon la revendication 8, vecteur d'expression selon la revendication 9, cellule hôte selon la revendication

10 ou composition pharmaceutique selon la revendication 11 , dans laquelle la molécule d'intérêt comprend ou consiste en un polypeptide d'intérêt choisi parmi un polypeptide codant la protéine eGFP représenté par la séquence SEQ ID NO : 17, un polypeptide codant la protéine eIF3f représenté par la séquence SEQ ID NO : 18, un polypeptide codant la protéine FERM représenté par la séquence SEQ ID NO : 19, un polypeptide codant la protéine MDA-7 représenté par la séquence SEQ ID NO : 20, un polypeptide codant la protéine MDA-7 tronquée représenté par la séquence SEQ ID NO : 21 et un polypeptide représenté par une séquence ayant 80%, notamment 90%, particulièrement 95% d'identité de séquence avec l'une des séquences SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 21.

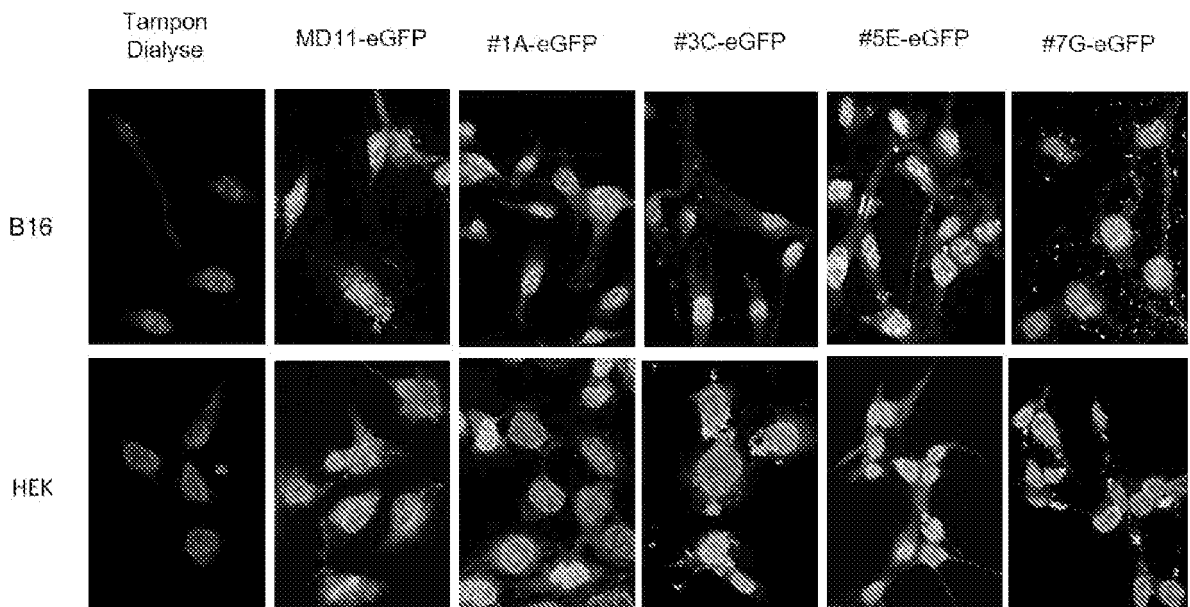
[Revendication 14] Combinaison ou protéine de fusion ou composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 12, dans laquelle la molécule d'intérêt comprend ou consiste en un polypeptide d'intérêt choisi parmi un polypeptide codant la protéine eGFP représenté par la séquence SEQ ID NO : 17, un polypeptide codant la protéine eIF3f représenté par la séquence SEQ ID NO : 18, un polypeptide codant la protéine FERM représenté par la séquence SEQ ID NO : 19, un polypeptide codant la protéine MDA-7 représenté par la séquence SEQ ID NO : 20, un polypeptide codant la protéine MDA-7 tronquée représenté par la séquence SEQ ID NO : 21 et un polypeptide représenté par une séquence ayant 80%, notamment 90%, particulièrement 95% d'identité de séquence avec l'une des séquences SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 21.

[Revendication 15] Protéine de fusion selon la revendication 7 comprenant ou consistant en une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 23 à SEQ ID NO : 29, SEQ ID NO : 31 à SEQ ID NO : 37, SEQ ID NO : 39 à SEQ ID NO : 45, SEQ ID NO : 47 à SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 55 à SEQ ID NO : 61.

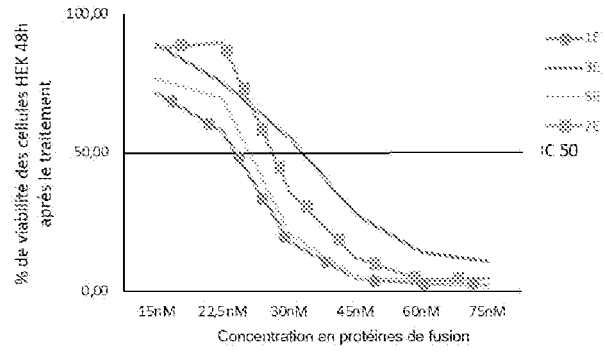
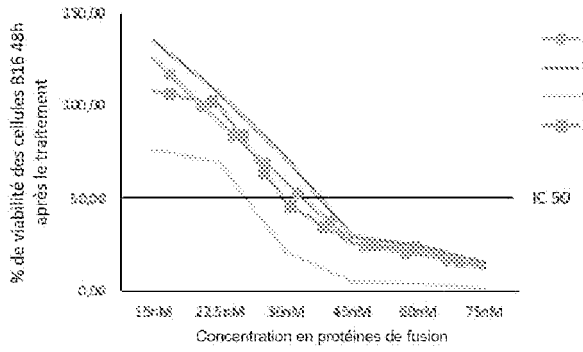
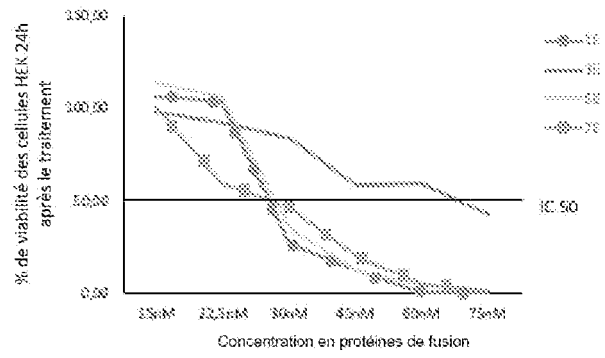
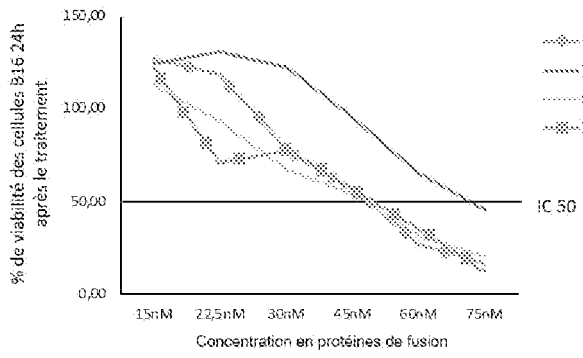
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

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

**FA 916668**  
**FR 2213003**

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y, D	WO 2011/135222 A2 (UNIV JOSEPH FOURIER [FR] ET AL.) 3 novembre 2011 (2011-11-03) * figure 1a * * exemple 1 *	1-15	A61K 38/16 A61K 39/245 A61K 47/42 A61K 47/62 A61P 35/00
Y, D	MARCHIONE ROBERTA ET AL: "MD11-mediated delivery of recombinant eIF3f induces melanoma and colorectal carcinoma cell death", MOLECULAR THERAPY- METHODS & CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 2, 1 janvier 2015 (2015-01-01), page 14056, XP093060200, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1038/mtm.2014.56 * alinéa [Introduction] *	1-15	C07K 14/05 C07K 19/00 C12N 15/62 C12N 15/63 G01N 33/68 C12N 15/38 C07K14/05 C12N15/38 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 A61K38/16 A61K39/245
Y	WO 2014/041505 A1 (UNIV GENEVE [CH]; HOPITAUX UNIVERSITAIRES GENEVE [CH]) 20 mars 2014 (2014-03-20) * page 16; exemples 1-5 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	WO 2016/146143 A1 (AMAL THERAPEUTICS SA [CH]) 22 septembre 2016 (2016-09-22) * figure 1; exemples 1-9 *	1-15	A61K A61P C07K
Y	WO 2017/152132 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 8 septembre 2017 (2017-09-08) * séquence 18 * & DATABASE Geneseq [Online]  19 octobre 2017 (2017-10-19), "Human MYC protein bHLHZ domain mutant inhibitor, SEQ ID 18.", extrait de EBI accession no. GSP:BEH45573 Database accession no. BEH45573 * séquence *	1-15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
<b>4 juillet 2023</b>		<b>Mabit, Hélène</b>	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	



**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2213003 FA 916668**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **04-07-2023**  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
<b>WO 2011135222 A2</b>	<b>03-11-2011</b>	<b>EP 2563399 A2</b>	<b>06-03-2013</b>
		<b>US 2013116201 A1</b>	<b>09-05-2013</b>
		<b>WO 2011135222 A2</b>	<b>03-11-2011</b>
-----			
<b>WO 2014041505 A1</b>	<b>20-03-2014</b>	<b>AU 2013316679 A1</b>	<b>12-03-2015</b>
		<b>CA 2884677 A1</b>	<b>20-03-2014</b>
		<b>CN 104736553 A</b>	<b>24-06-2015</b>
		<b>EP 2895499 A1</b>	<b>22-07-2015</b>
		<b>JP 6306593 B2</b>	<b>04-04-2018</b>
		<b>JP 2016501829 A</b>	<b>21-01-2016</b>
		<b>KR 20150107708 A</b>	<b>23-09-2015</b>
		<b>RU 2015113378 A</b>	<b>10-11-2016</b>
		<b>US 2015239938 A1</b>	<b>27-08-2015</b>
		<b>WO 2014041505 A1</b>	<b>20-03-2014</b>
-----			
<b>WO 2016146143 A1</b>	<b>22-09-2016</b>	<b>AU 2016232656 A1</b>	<b>10-08-2017</b>
		<b>AU 2016232657 A1</b>	<b>10-08-2017</b>
		<b>AU 2016232659 A1</b>	<b>10-08-2017</b>
		<b>AU 2021218097 A1</b>	<b>09-09-2021</b>
		<b>AU 2021282506 A1</b>	<b>06-01-2022</b>
		<b>BR 112017015906 A2</b>	<b>10-04-2018</b>
		<b>CA 2973747 A1</b>	<b>22-09-2016</b>
		<b>CA 2973757 A1</b>	<b>22-09-2016</b>
		<b>CA 2973770 A1</b>	<b>22-09-2016</b>
		<b>CL 2017002345 A1</b>	<b>18-05-2018</b>
		<b>CN 107428845 A</b>	<b>01-12-2017</b>
		<b>DK 3270955 T3</b>	<b>16-03-2020</b>
		<b>DK 3270957 T3</b>	<b>30-03-2020</b>
		<b>EA 201792045 A1</b>	<b>30-03-2018</b>
		<b>EP 3270954 A1</b>	<b>24-01-2018</b>
		<b>EP 3270955 A1</b>	<b>24-01-2018</b>
		<b>EP 3270957 A1</b>	<b>24-01-2018</b>
		<b>EP 3693009 A1</b>	<b>12-08-2020</b>
		<b>ES 2781454 T3</b>	<b>02-09-2020</b>
		<b>ES 2781455 T3</b>	<b>02-09-2020</b>
		<b>HR P20200491 T1</b>	<b>26-06-2020</b>
		<b>HU E048807 T2</b>	<b>28-08-2020</b>
		<b>HU E048808 T2</b>	<b>28-08-2020</b>
		<b>IL 285273 A</b>	<b>30-09-2021</b>
		<b>JP 6862369 B2</b>	<b>21-04-2021</b>
		<b>JP 6882207 B2</b>	<b>02-06-2021</b>
		<b>JP 6993240 B2</b>	<b>15-02-2022</b>
<b>JP 7179896 B2</b>	<b>29-11-2022</b>		
<b>JP 7190528 B2</b>	<b>15-12-2022</b>		
<b>JP 2018509935 A</b>	<b>12-04-2018</b>		
<b>JP 2018509936 A</b>	<b>12-04-2018</b>		

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2213003 FA 916668**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **04-07-2023**  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
		JP 2018510215 A	12-04-2018	
		JP 2021104038 A	26-07-2021	
		JP 2021119182 A	12-08-2021	
		KR 20170128516 A	22-11-2017	
		KR 20210013670 A	04-02-2021	
		LT 3270955 T	11-05-2020	
		PH 12017501287 A1	05-02-2018	
		PL 3270955 T3	27-07-2020	
		PL 3270957 T3	27-07-2020	
		PT 3270955 T	09-04-2020	
		PT 3270957 T	21-04-2020	
		SI 3270955 T1	31-08-2020	
		US 2018133295 A1	17-05-2018	
		US 2018133327 A1	17-05-2018	
		US 2018133338 A1	17-05-2018	
		US 2018133339 A1	17-05-2018	
		US 2022031850 A1	03-02-2022	
		US 2022040314 A1	10-02-2022	
		US 2022175933 A1	09-06-2022	
		WO 2016146143 A1	22-09-2016	
		WO 2016146259 A1	22-09-2016	
		WO 2016146260 A1	22-09-2016	
		WO 2016146261 A1	22-09-2016	
		WO 2016146262 A1	22-09-2016	
-----				
WO 2017152132	A1	08-09-2017	US 2019085404 A1	21-03-2019
			WO 2017152132 A1	08-09-2017
-----				

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82