



SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie
Office de la Propriété intellectuelle

(11) 1031668 B1

(47) Date de délivrance : 16/01/2025

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 16/01/2025

(21) Numéro de demande : BE2023/5457

(22) Date de dépôt : 02/06/2023

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 9/00, A61K 9/12, A61K 9/51, A61K 47/28, A61K 47/24, A61K 47/69, A61K 31/7084, A61P 11/00, A61P 35/00

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

INHATARGET THERAPEUTICS
SRL
6041 , GOSSELIES
Belgique

(72) Inventeur(s) :

ROSIERE Rémi Rudy Brigitte Marie
1170 WATERMAEL-BOITSFORT
Belgique

AMIGHI Karim
1150 WOLUWE-SAINT-PIERRE
Belgique

DAVENNE Tamara Sylviane Andréa
7181 ARQUENNES
Belgique

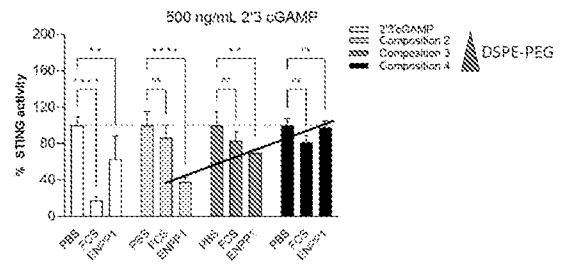
PERCIER Pauline
6230 OBAIX
Belgique

LADAYCIA Abdallah
1050 IXELLES
Belgique

(54) COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR INHALATION

(57) Une composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques comprenant des véhicules lipidiques comprenant un agent pharmaceutique, ses utilisations thérapeutiques et son procédé de fabrication.

FIG. 1



COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR INHALATION

Domaine technique

La présente invention concerne une composition lipidique protégeant un agent pharmaceutique et destinée à être administrée
5 dans le tractus respiratoire à un patient.

L'art antérieur

La formulation telle que le piégeage lipidique d'agents pharmaceutiques est bien connue.

En particulier, l'utilisation à cette fin de lipides et notamment
10 des lipides cationiques sélectionnés en fonction de la nature de l'agent pharmaceutique à piéger et du type de véhicules à obtenir est connue. Certains de ces lipides présentent, cependant, une toxicité clinique, ce qui limite les options (quantité, nature). En outre, la taille du liposome, en ce compris la dispersion des tailles, la stabilité de la composition dans les
15 milieux biologiques, sa capacité à piéger l'agent pharmaceutique, ou à le relarguer à l'endroit voulu représentent autant de facteurs difficiles à optimiser, surtout conjointement.

Ji et al., 2023, décrivent l'utilisation de liposomes pour la potentialisation de l'activation de la voie STING (Stimulator of Interferon
20 Genes) : cette approche a été conçue sur base de dinucléotides cycliques, qui sont protégés par la structure lipidique. Différentes formulations de liposomes ont été réalisées à base de DOTAP (1,2,-dioléoyl-3-triméthylamonium-propane), de cholestérol et d'une phospho-éthanolamine dérivatisée par polyéthylène glycol. Des bons taux
25 d'encapsulation ont été obtenus pour des rapports molaires DOTAP/agoniste compris entre 10 et 20 alors qu'à un ratio de 2,5, l'efficacité d'encapsulation est mauvaise, ce qui est attribué à une trop

faible densité de charges positives. De même, à ces faibles ratios de concentration, la potentialisation de l'effet biologique par le liposome est perdue.

Malheureusement, le faible niveau d'encapsulation implique
5 une administration massive de liposomes à un patient, ce qui présente des risques de toxicité, en particulier due aux grandes quantités des lipides cationiques, abondant dans les liposomes de cette étude.

D'autre part, la modification de la teneur en un composé
n'est pas simple car plusieurs propriétés physico-chimiques du liposome
10 doivent correspondre à des valeurs acceptables pour administration à un patient, telles que la taille, la dispersion de la taille et le potentiel de charge électrique ; tout en garantissant la stabilité de la formulation. En d'autres termes, dans une formulation, l'enrichissement en un composant se fait au détriment des autres, ce qui risque d'en affecter fortement
15 l'équilibre : les inventeurs ont remarqué que cet équilibre est fonction de différents ratios de concentrations, qui peuvent être fortement affectés même suite à des adaptations des concentrations qui auraient pu sembler marginales.

Ainsi, les inventeurs ont remarqué qu'il persiste encore un
20 besoin pour des formulations améliorées au bénéfice des patients.

Bref résumé de l'invention

Un premier aspect de la présente invention porte sur une composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques comprenant des véhicules lipidiques formés d'une
25 série de lipides avec au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206), ces véhicules lipidiques comprenant un agent pharmaceutique choisi dans le groupe constitué de un acide nucléique, un agoniste de la protéine STING ou un

antagoniste de la protéine STING, un ligand des récepteurs de type Toll, un immunomodulant, un peptide, ou un mélange de ceux-ci.

De préférence, cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques est administrable par inhalation, avantageusement par nébulisation et/ou par inhalation pressurisée et/ou par inhalation de poudre sèche et/ou par inhalation à pulvérisation douce.

Un aspect lié de la présente invention porte sur cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques pour le traitement d'un cancer, de préférence un cancer métastatique, de préférence ladite métastase étant en-dehors du poumon ou du système nerveux central et la tumeur primaire étant pulmonaire ou localisée au niveau du système nerveux central, ou ladite métastase étant pulmonaire ou localisée au niveau du système nerveux central et la tumeur primaire étant en-dehors du poumon ou du système nerveux central.

Un aspect lié de la présente invention porte sur cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques pour le traitement d'une maladie infectieuse au niveau du tractus respiratoire et / ou systémique, ou du système nerveux central.

Un aspect lié de la présente invention porte sur cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritique comprenant un acide nucléique encodant un ou plusieurs épitope(s), ou un peptide comprenant un ou plusieurs épitopes, ladite composition pharmaceutique étant pour la vaccination.

Un aspect lié de la présente invention porte sur un procédé pour l'obtention de cette composition pharmaceutique d'activation des macrophages et/ou de cellules dendritiques comprenant les étapes

- de solubilisation des lipides dans un solvant organique,
- 5 - d'évaporation du solvant de manière à former un film lipidique,
- de réhydratation avec une solution contenant l'agent pharmaceutique,
- 10 - d'extrusion et d'insertion d'un lipide dérivatisé avec un ligand du récepteur CD206,
- de préférence une seconde étape de mise en contact d'une solution contenant l'agent pharmaceutique avec les lipides extrudés.

15 lesdits lipides comprenant un lipide neutre à pH 7,0 et chargé positivement à pH 5, et ladite étape de rehydratation étant pratiquée à pH inférieur à 7,0.

Brève description des dessins

La figure 1 compare la stabilité de structures lipidiques différentes.

20 La Figure 2 compare l'effet de la fonctionnalisation sur l'activation de macrophages.

Description détaillée d'une réalisation de l'invention

Les inventeurs ont réussi à développer des formulations à base de lipides qui permettent un piégeage important d'un (ou de plusieurs)
25 agent(s) pharmaceutique(s), tout en conservant des propriétés physico-chimiques avantageuses et compatibles avec un usage clinique.

Ainsi, un premier aspect de la présente invention porte sur une composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques comprenant des véhicules lipidiques formés d'une série de lipides avec au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) et les
5 véhicules lipidiques comprennent au moins un agent pharmaceutique choisi dans le groupe constitué de au moins un acide nucléique, au moins un agoniste de la protéine STING ou au moins un antagoniste de la protéine STING, au moins un ligand des récepteurs de type Toll, un
10 immunomodulant, un peptide, et leurs mélanges (sauf l'agoniste de STING avec l'antagoniste de STING), cette composition pharmaceutique étant de préférence pour inhalation.

Les véhicules lipidiques sont avantageusement choisis dans le groupe constitué des liposomes, des vésicules, des micelles, des
15 lipoplexes, des émulsions lipidiques, des nanocristaux lipidiques, des microsphères lipidiques, des nanoparticules lipidiques, et de leurs mélanges.

Dans le contexte de la présente invention, la terminologie « par inhalation » a trait à la fois à une administration nasale (ex. pour
20 atteindre la cavité nasale, le système nerveux central et / ou la circulation systémique ; ex. traitement d'une tumeur, thérapie génique, traitement d'une inflammation ou d'une infection) et à une administration pulmonaire (ex. pour y traiter une maladie, telle qu'une inflammation, une infection ou une tumeur), et une administration nasale pour cibler une
25 déposition à la fois nasale et pulmonaire.

Dans le contexte de la présente invention, on entend, de préférence, par « peptide » toute chaîne d'au moins 2 acides aminés reliés par des liens peptidiques. Des peptides avantageux sont une

protéine (y compris une enzyme), un antigène (un épitope), un anticorps, (ou un fragment d'anticorps, un nanobody).

Avantageusement, l'agent pharmaceutique comprend au moins un acide nucléique choisi dans le groupe constitué de l'ADN simple
5 brin, l'ADN double brin (y compris, un ADNc), un ARN simple brin (y compris un ARNm), un ARN double brin, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un oligonucléotide (à base d'ADN et/ou d'ARN), et leurs mélanges. Les nucléotides, les sucres ou les liens phosphodiester peuvent
10 avantageusement être modifiés, par exemple l'uridine peut être substituée ou partiellement substituée par la pseudouridine, par exemple lorsque l'acide nucléique est un ARNm. Les bases adénosine ou cytosine peuvent avantageusement être méthylées, tout comme les sucres (ex. en position 2'). Des liens « peptide nucleic acids », morpholino et/ou phosphorothioate peuvent avantageusement remplacer une partie ou la
15 totalité des liens phosphodiester. Alternativement, lorsque l'acide nucléique est pour stimuler une réponse immune et comprend des motifs CpG, la cytosine n'est avantageusement pas méthylée.

Avantageusement, l'agent pharmaceutique comprend au moins un agoniste de la protéine STING, de préférence choisi dans le
20 groupe constitué du cGAMP, du 2',3'cGAMP, du DMXAA, du ADU-S100, du MK-1454, du MK-2118, du GSK-3745417, du BMS-986301, du SB-11285, du IMSA-101, du SYN-STING (SYNB1891), du BI-1387446, du TAK-676, du E-7766 exoSTING, du SNX281, du HG-381, du DN-015089, du PC7A, du DiABZI, du Di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMP cyclique ; cyclic di-
25 GMP), du MSA-2, du ulevostinag, du SB 11285, du IMSA 101, du Dazostinag, du BMS-986301, du BI 1387446 et de leurs mélange, de préférence le 2',3'cGAMP.

Alternativement, l'agent pharmaceutique comprend au moins un antagoniste de la protéine STING choisi dans le groupe

comprenant le C-176, le H-151, le Inh-54, le RU.521, le H-8, le A151, le SA-1, le GSK'932, le SN-011 et leurs mélanges.

De préférence, la série de lipides formant les véhicules lipidiques présente une température de transition de phase (T_m) comprise
5 entre -30°C et 100°C , de préférence entre 1°C et 90°C , avantageusement entre 10°C et 80°C , 20°C et 70°C , par exemple entre 20°C et 60°C .

De préférence (alternativement, ou en outre), la série de lipides formant les véhicules lipidiques présente un point de fusion compris
10 entre -30°C et 180°C , de préférence entre 1°C et 160°C , avantageusement entre 10°C et 155°C , préférentiellement entre 20°C et 150°C , par exemple entre 20°C et 80°C .

Ces propriétés physicochimiques de la série de lipides augmentent le relargage de l'agent pharmaceutique dans les tissus ciblés et/ou le relargage cytoplasmique de l'agent pharmaceutique
15 et/ou sa demi-vie et/ou réduisent le relargage de l'agent pharmaceutique dans les tissus non-ciblés. En particulier, les inventeurs ont noté qu'une température de transition de phase (T_m) élevée de la série de lipides, par exemple plus de 10°C , plus de 20°C , est associée à une rigidité accrue, ce qui est avantageux, au moins pour certaines
20 formulations ou modes d'administration au patient.

Avantageusement, l'au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) est un phospholipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206),

25 Avantageusement (en outre) au moins un lipide, de préférence un phospholipide, est dérivatisé par le polyéthylène glycol (PEG).

Un PEG de taille comprise entre 500 Da et 20 kDa est préféré, par exemple entre 1 et 10 kDa, voire entre 2 et 5 kDa.

De préférence, un lipide, de préférence un phospholipide, dérivatisé par le PEG, avantageusement un DSPE-PEG, présente une
5 fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206).

Avantageusement, entre 10% et 100% (équivalent mole), de préférence entre 20 et 90%, de préférence entre 30 et 80%, voire entre 40 et 50% des lipides dérivatisés au PEG est en outre fonctionnalisé par le
10 dérivatisés au PEG n'est pas nécessairement fonctionnalisée. Les inventeurs ont en effet noté que la double optimisation, la teneur en PEG et celle en ligand du récepteur CD206, était avantageusement réalisée de cette manière. Lorsque certains résidus PEG ne sont pas fonctionnalisés par le ligand du récepteur CD206, cet objet de la présente invention peut
15 être réalisé soit sur base d'un seul lipide, de préférence un seul phospholipide, dérivatisé par le PEG, dont seule une proportion serait fonctionnalisée, soit sur base de plusieurs lipides, de préférence comprenant au moins un phospholipide, qui seraient dérivatisés au PEG, avec certaines de ces molécules dérivatisées au PEG qui ne seraient pas
20 fonctionnalisées.

Ceci augmente la capacité au ligand de se fixer à son récepteur. En outre le PEG stabilise les véhicules lipidiques.

Avantageusement, le ligand du récepteur au mannose (CD206) est choisi dans le groupe comprenant un mannose, un fucose,
25 une N-acétylglucosamine, une N-acétylgalactosamine, une glycoprotéine, un galactocomannane, un α -D-mannopyranoside (ex. l' α -D-Mannopyranose), l' α -L-fucopyranose-(1-3)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose, le Methyl α -D-mannopyranoside, l' α -L-fucopyranose -(1-2)- β -D-galactopyranose-(1-4)- β -D-glucopyranose, le Methyl 2-

acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside, le β -D-galactopyranose-(1-3)-
(α -L-Fucopyranose-(1-4)) 2-acetamido-d-deoxy- β -D-glycopyranose, l' α -
D-mannopyranose-(1-2)- α -D-mannopyranose, un polymannose (entre 4
et 50, de préférence entre 5 et 30, voire entre 6 et 20 résidus mannose) un
5 anticorps anti-CD206, et leurs mélanges.

Dans le contexte de la présente invention, ces ligands
peuvent être modifiés, par exemple la N-acétylglucosamine peut être
déacétylée. Par exemple, la N-acétylglucosamine est incorporée sous
forme de chitine ou de chitosan, de préférence des oligomères de chitine
10 ou de chitosan (ex. moins de 50 monomères, moins de 40 monomères,
moins de 30 monomères).

De préférence, les véhicules lipidiques sont des
nanoparticules lipidiques (LNPs), de préférence des liposomes ou des
nanoparticules lipidiques solides (SLN) ou des transporteurs lipidiques
15 nanostructurés (NLC).

Dans le contexte de la présente invention, on entend de
préférence par « SLN » des particules colloïdales (généralement de 50 à
500 nm de diamètre) préparées à partir de lipides solides (solides à
température ambiante et à température corporelle), de tensioactifs et
20 d'eau par des méthodes d'homogénéisation à haute vitesse ou haute
pression.

Dans le contexte de la présente invention, on entend de
préférence par « NLC » des SLNs contenant une fraction de lipides liquides
(huile) qui provoque des imperfections structurales des lipides solides
25 conduisant à un arrangement cristallin moins ordonné afin d'améliorer
l'encapsulation d'agent pharmaceutique. Elles sont préparées par des
méthodes similaires aux SLNs.

Dans le contexte de la présente invention, on entend de préférence par « liposomes » des vésicules lipidiques sphériques (généralement de 50 à 500 nm de diamètre) composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ils résultent de l'émulsification de lipides naturels ou synthétiques dans un milieu aqueux par des méthodes comme l'hydratation du film lipidique, la méthode d'injection d'éthanol ou par des méthodes microfluidiques.

De préférence, l'agent pharmaceutique présente une charge globale négative.

En effet, les inventeurs ont réussi à incorporer de grandes quantités de ce type d'agent, même en proportion molaire du lipide cationique (ou protonable, voir ci-dessous) potentiellement présent.

Ainsi, la série de lipides comprend de préférence un premier lipide choisi dans le groupe comprenant un lipide cationique, un lipide neutre, un lipide anionique, un phospholipide, un triglycéride, un diglycéride, un glycérophospholipide, une sphingomyéline, un acide gras, un sel d'acide gras, et/ou un deuxième lipide choisi dans le groupe comprenant un lipide cationique, un lipide neutre, un lipide anionique, un phospholipide, un triglycéride, un diglycéride, un glycérophospholipide, une sphingomyéline, un acide gras, un sel d'acide gras, et/ou un troisième lipide choisi dans le groupe comprenant un lipide cationique, un lipide neutre, un lipide anionique, un phospholipide, un triglycéride, un diglycéride, un glycérophospholipide, une sphingomyéline, un acide gras, un sel d'acide gras.

De préférence, la composition pharmaceutique comprend un premier lipide étant un lipide cationique ayant au moins un groupement ammonium quaternaire, et/ou un lipide ayant au moins un groupement amine (secondaire ou tertiaire) protonable (et exempt de charge négative à pH 7,0).

De préférence, le lipide ayant au moins un groupement ammonium quaternaire (et/ou premier lipide) est choisi dans le groupe constitué du DOTAP (le 18:1 TAP) ainsi que les autres dérivés TAP (tels que le 14:0 TAP, le 16:0 TAP, le 18:0 TAP), le DOTMA, le DDAB, le DC-Chol, le
5 DODAP, le MVL5, le DOSPA, le GL67, le DOBAQ, les dérivés EPC (12:0 EPC, 14:0 EPC, 16:0 EPC, 18:0 EPC, 18:1 EPC, 14:1 EPC, 16:0-18.1 EPC), le DORI, le DC-6-14, et leurs mélanges. Le DOTAP est préféré.

Par amine (secondaire ou tertiaire) protonable, l'on entend de préférence dans le contexte de la présente invention, une amine qui
10 est majoritairement sous forme neutre à pH7,0, (ex. plus de 50%, de préférence plus de 75%, voire plus de 90 ou 99% sous forme neutre à pH7,0) et majoritairement sous forme protonée à pH 5,0 (ex. plus de 50%, de préférence plus de 75%, voire plus de 90 ou 99% sous forme protonée à pH5,0).

15 Un exemple de lipide comprenant une amine protonable est le 1,2-dioleoyloxy-3-diméthylaminopropane (DODMA). Il est entendu, dans le contexte de la présente invention, que d'autres chaînes lipidiques que l'acide oléique peuvent être substitués à celle-ci, par exemple l'acide palmitique ou l'acide stéarique tout en conservant les dérivés
20 Diméthyleaminopropane (DMA ; tels que le 18:0 DMA, le 16:0 DMA, le 14:0 DMA, le 18:1 DMA). Réciproquement (ou en addition) des substitutions au niveau du groupement aminopropane sont possibles, par exemple au niveau des groupements méthyle du DMA.

De préférence, le second lipide est un stérol et est
25 avantageusement choisi dans le groupe constitué du cholestérol et ses esters (cholesteryl esters), et ses dérivés glycosylés (β -D-glucosyl cholesterol, Galactosyl Cholesterol, le BbGL-1), le ox-18:2 cholesterol, le desmosterol, le stigmasterol, le lanosterol, le 7-dehydrocholesterol,

dihydrolanosterol, le zymosterol, le lathosterol, et leurs mélanges. Le cholestérol est très préféré.

Ainsi, une composition comprenant du DOTAP et du cholestérol est très préférée.

5 De préférence, le phospholipide potentiellement présent dans cette composition pharmaceutique (second lipide en l'absence de stérol, troisième et/ou quatrième lipide) est choisi parmi les phospholipides naturels, purifiés ou synthétiques, comme les phospholipides extraits d'œuf ou de soja, les acides phosphatidiques, phosphatidyléthanolamines (PE),
10 les lysophosphatidylethanolamines (LPE) ou les phosphatidylcholines (PC) ou les lysophosphatidylcholine (LPC) ou les phosphatidylsérines (PS), ou les lysophosphatidylsérines (LPS) ou les phosphatidylglycerol (PG) ou les lysophosphatidylglycerol (LPG) et leurs mélanges, de préférence choisi dans le groupe comprenant le DSPE, le DSPE-PEG, le DMPE, le DPPC, le
15 DSPC, le DMPC, le DLPC, et leurs mélanges.

Dans le contexte de la présente invention, de préférence, les chaînes d'acide gras constitutives des phospholipides, mais également des lipides cationiques ou protonables peuvent être saturées, insaturées ou poly-insaturées, pour autant que les paramètres ci-dessous de point de
20 fusion et/ou de température de transition de phase (mesurés sur l'ensemble des lipides utilisés) soient dans les plages décrites. Ainsi la composition selon l'invention peut avantageusement contenir des acides gras insaturés et des acides gras saturés.

Les chaînes d'acides gras constitutives des phospholipides ci-dessus ont une taille avantageusement comprise entre 14 et 20 atomes
25 carbonés, telle que de 16 ou 18 atomes de carbone. Des tailles plus courtes ou plus longues sont possibles (dans des faibles teneurs, ex. moins de 20% en moles de l'ensemble des lipides) pour autant que les paramètres ci-dessous de point de fusion et/ou de température de

transition de phase (mesurés sur l'ensemble des lipides utilisés) restent comprises dans les plages décrites.

Avantageusement, le lipide anionique, lorsqu'il est présent, est choisi parmi les phosphatidylinositole (PIs) et leurs phosphates (PIPs), les
5 phosphatidylsérines (PS ; ex le DPPS), acide phosphatidique (PA ; ex. le DPPA) et les phosphatidylglycérols, (ex. le DPPG ou le DSPG) et les mélanges de ceux-ci.

De préférence, la composition comprend une phosphatidylcholine, tel que du DPPC (la 1,2-
10 dipalmitoylphosphatidylcholine).

Les inventeurs ont remarqué que ce lipide possédant une tête polaire et deux chaînes hydrocarbonées insaturées (di-palmitoyl) augmentait la rigidité des structures lipidiques et/ou permettait une réduction de la teneur (relative) en DOTAP. Une incorporation du DPPC
15 dans un ratio molaire compris entre 0,1 et 0,95, de préférence entre 0,2 et 0,90, de préférence entre 0,5 et 0,8, ou encore entre 0,6 et 0,7 (mole phosphatidylcholine, ex. DPPC : total des moles de lipides) par rapport à l'ensemble des lipides est préférée.

De préférence, les véhicules lipidiques de la composition
20 pharmaceutique présentent un rapport molaire du premier lipide au deuxième lipide (ou au troisième lipide si le deuxième lipide est absent) compris entre 0,3 et 20, de préférence entre 0,5 et 10, tel qu'entre 1 et 5.

De préférence, les véhicules lipidiques de la composition pharmaceutique présentent un rapport molaire dudit au moins un lipide
25 présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) aux lipides totaux comprise entre 0,01 à 0,2, de préférence entre 0,02 et 0,1, de préférence entre 0,03 et 0,05.

Avantageusement, la proportion molaire dudit au moins un agent pharmaceutique par rapport audit au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) est comprise entre 5 (ou 10) et 150, de préférence entre 20 et 100, voire
5 entre 30 et 80.

Avantageusement, les véhicules lipidiques présentent une proportion molaire dudit lipide cationique et/ou ionisable par rapport à l'agent pharmaceutique comprise entre 30 et 0,1, de préférence entre 10 et 0,2, avantageusement entre 3 et 0,5, de préférence entre 2,5 et 0,8,
10 préférentiellement entre 2,4 et 1.

De préférence, la composition pharmaceutique a un taux de charge de l'agent pharmaceutique compris entre 0,1 et 80% par rapport à la masse des véhicules lipidiques, de préférence entre 1 et 70%, de préférence entre 10 et 60%, de préférence entre 15 et 50%, tel qu'entre
15 20 et 40% ou encore entre 25 et 30%.

Avantageusement, la taille moyenne des véhicules lipidiques est comprise entre 50 et 200 nm, de préférence comprise entre 60 et 190 nm, avantageusement comprise entre 70 et 180 nm, préférentiellement comprise entre 80 et 180 nm, de manière préférée comprise entre 90 et
20 180 nm, de manière plus préférée comprise entre 100 et 180 nm, de préférence comprise entre 110 et 180 nm, avantageusement comprise entre 120 et 180 nm, préférentiellement comprise entre 120 et 170 nm, de manière préférée comprise entre 120 et 160 nm.

Alternativement la taille moyenne des véhicules lipidiques est
25 comprise entre 350 et 1500 nm, de préférence entre 350 et 1400 nm, avantageusement entre 350 et 1300 nm, préférentiellement entre 350 et 1200 nm, avantageusement entre 350 et 1100 nm, préférentiellement entre 350 et 1000 nm, de préférence entre 350 et 900 nm, de manière préférée entre 350 et 800 nm, plus particulièrement entre 350 et 700 nm,

de manière avantageuse entre 350 et 600 nm, par exemple entre 400 et 600 nm.

Alternativement la taille moyenne des véhicules lipidiques est comprise entre 200 et 350 nm.

- 5 De préférence la taille (moyenne) et le diamètre moyen (D_h) des véhicules lipidiques est mesurée par diffusion de la lumière dynamique (DLS).

Avantageusement, les véhicules lipidiques présentent un indice de polydispersité compris entre 0,05 et 0,9, de préférence compris
10 entre 0,1 et 0,8, avantageusement compris entre 0,2 et 0,75, préférentiellement compris entre 0,3 et 0,7, de manière préférée comprise entre 0,4 et 0,6 ; de préférence l'indice de polydispersité étant mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Un appareillage préféré, tant
15 du potentiel zêta (voir ci-dessous ; même si d'autres appareillages sont aussi utilisés) est le Malvern Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments SA, Worcestershire, UK).

Avantageusement, dans le contexte de la présente invention, l'indice de polydispersité est défini par la formule :

$$PI = 2 \bar{x}_{DLS}^2 \frac{\sum_{i=1}^N \Delta Q_{int,i} (1/x_i^2 - 1/\bar{x}_{DLS}^2)}{\sum_{i=1}^N \Delta Q_{int,i}}$$

20

où $\bar{x}_{DLS}$ est la moyenne du diamètre des particules, $\Delta Q_{int,i}$ la quantité de particules avec une taille x_i et x_i étant le diamètre de la particule sphérique.

Alternativement, l'indice de polydispersité est
25 avantageusement compris entre 0,05 et 0,9, de préférence compris entre

0,05 et 0,8, avantageusement compris entre 0,05 et 0,7, plus avantageusement compris entre 0,05 et 0,6, encore plus avantageusement compris entre 0,05 et 0,5, préférentiellement compris entre 0,05 et 0,4, avantageusement compris entre 0,05 et 0,3, plus particulièrement compris entre 0,05 et 0,25, de préférence compris entre 0,05 et 0,2, par exemple compris entre 0,06 et 0,2, préférentiellement compris entre 0,07 et 0,2, avantageusement compris entre 0,08 et 0,2, mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

En effet, selon les applications, des particules de véhicules lipidiques de mêmes tailles sont préférées, alors que pour d'autres applications, une distribution bimodale, voire multimodale est préférée.

De préférence, les véhicules lipidiques présentent un potentiel zêta compris entre -60 mV et 100 mV, de préférence entre -40 mV et 80mV, avantageusement entre -20mV et 60mV, préférentiellement entre 0 mV et 50mV, de préférence entre 10 mV et 40 mV, avantageusement entre 10 mV et 30 mV, mesuré avantageusement par « laser doppler electrophoresis ». De préférence, cette mesure est réalisée dans une solution aqueuse de NaCl à 0,009% (masse :volume).

Avantageusement, ledit agent pharmaceutique est présent dans une proportion massique comprise entre 0,1 et 80%, de préférence entre 1 et 70%, de préférence entre 5 et 60%, de préférence entre 10 et 50% ou entre 20 et 40%, par rapport à la masse des véhicules lipidiques.

Avantageusement, la composition contient au moins un ion métallique comme le Mn^{2+} , le Co^{2+} ou le Zn^{2+} afin de potentialiser l'activité de l'agent pharmaceutique. De préférence ce ou ces ions métalliques sont incorporés dans une teneur supérieure à 10 PPM (partie par million ; teneur pondérale ; masse du ou des ions métalliques :masse totale (sèche) de la composition lipidique), de préférence à une teneur comprise entre 100 PPM et 50% en masse (masse du ou des ions

métalliques :masse totale (sèche) de la composition lipidique), de préférence entre 300 PPM et 10%, de préférence entre 800 PPM et 1% (en masse).

5 Un aspect lié de la présente invention porte sur une composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques sous forme liquide comme une solution, une dispersion ou une suspension, ou sous forme d'une poudre destinée à être redissoute et redispersée avant administration, ou sous forme de poudre sèche pour inhalation.

10 Avantageusement, cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques sous forme liquide pourra être congelée pour garantir une bonne stabilité lors du stockage ou de la distribution du médicament. Cette composition sera alors décongelée avant administration et permettra de reconstituer les
15 véhicules lipidiques de manière avantageuse. Ceci assure en outre que la formulation conserve un maximum d'activité.

Avantageusement, cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques comprend au moins un excipient choisi dans le groupe constitué de

20 un tampon choisi dans le groupe comprenant les tampons phosphate, sulfonate (MES, TES, HEPES, MOPS, PIPES, TAPS, TAPSO), acétate, bicine, et/ou

au moins un sel choisi dans le groupe des sels inorganiques et des sels organiques, et/ou

25 au moins un surfactant choisi dans le groupe comprenant les acides choliques et leurs sels,

les phospholipides (ex. les phosphatidylcholines ou
lécithine, les phosphatidylglycerols),

les lipides ou triglycérides,

les esters de sorbitan, les sorbitan polyéthoxylés,

5 les acides gras, de préférence l'acide laurique,
palmitique, stéarique, érucique ou béhénique, des esters de ces
acide gras, ou des dérivés de ces acides gras, tels que des sels, de
préférence choisis parmi le stéarate de magnésium, le sodium
stéaryl fumarate et le sodium stéaryl lactylate, sodium lauryl sulfate,
10 magnesium lauryl sulfate,

les composants naturel du surfactant pulmonaire
comme des phospholipides ou du cholestérol; et

les sucroesters (sugar esters, par exemple des esters
entre le sucrose ou le glucose et des acide gras) et/ou

15 au moins un acide aminé choisi dans le groupe constitué de
l'histidine, de la leucine, l'isoleucine, la thréonine, la lysine, la valine, la
methionine, la phenylalanine, leurs mélanges et leurs dérivés, tels que
l'acésulfame K ou l'aspartame et/ou

un sucre, de préférence choisi dans le groupe des
20 monosaccharides (tels que le glucose ou l'arabinose), des disaccharides
(tels que le lactose, le maltose, le saccharose, le dextrose, le trehalose, le
maltitol et leurs mélanges ou un agent de charge choisi parmi les polyols
tels que le sorbitol, le mannitol et le xylitol), des polysaccharides (tels que
le dextran, le chitosan, l'amidon, la cellulose, and ses dérivés), des
25 oligosaccharides (tels que la cyclodextrine et les dextrines).

Une option avantageuse pour la composition
pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules

dendritiques est le séchage sous forme d'une poudre pour garantir une bonne stabilité lors du stockage, à dissoudre ou redisperser par exemple juste avant l'administration à un patient (ex. moins de 1 heure). Cette composition sera alors redissoute ou redispersée avant administration dans un solvant aqueux tel que de l'eau ou une solution ou un tampon physiologique comme une solution de NaCl 0.9% (masse :volume) ou du PBS, et permettra de reconstituer les véhicules lipidiques de manière avantageuse. Ceci assure en outre que la formulation conserve un maximum d'activité.

Alternativement ou en outre, la composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'invention est sous forme d'une poudre pour garantir une bonne stabilité lors du stockage ou de la distribution du médicament, à dissoudre ou redisperser et comprend au moins un agent de charge tel qu'un polyol et/ou un alcool de sucre (« sugar alcohol » en anglais) tels que le sorbitol, le mannitol, le maltitol (parfois considéré comme un disaccharide) et le xylitol, des sucres (cristallins) en ce compris les monosaccharides (glucose, arabinose), les disaccharides (lactose, maltose, saccharose, dextrose, tréhalose), et les polysaccharides (dextran, chitosan, amidon, cellulose et ses dérivés), ou encore les oligosaccharides (dextrines, cyclodextrines) et/ou

des sels d'acide gras (ex. stéarate de magnésium) ou des acides gras ou leurs dérivés (ex. esters), tels que l'acide laurique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide érucique, l'acide béhénique, ou un phospholipide (ex. lécitine, phosphatidylcholine phosphatidilglycérol ; de préférence non incorporé dans le véhicule lipidique), des triglycérides (de préférence non incorporées dans le véhicule lipidique), des esters de sucres, et/ou un acide aminé (cfr ci-dessus pour la composition liquide) et leurs mélanges. Le dextran, le tréhalose, le mannitol et le lactose sont préférés.

Avantageusement, un excipient agent de charge sera utilisé, comme le lactose, le tréhalose le sucrose ou le mannitol. Dans ce cas, la composition, même sous forme de poudre comprendra avantageusement un tampon et en plus un ou plusieurs des composés listés ci-dessus, par exemple un surfactant.

De préférence la forme liquide à administrer comprenant la composition pharmaceutique selon l'invention comprend de 50 à 99% en eau (masse de l'eau : masse totale de la composition), de préférence de 70 à 98% d'eau, voire de 80 à 95 (ou 90%) % d'eau ; en d'autres termes, la solution comprend de 1 à 50% de la composition pharmaceutique, de préférence de 2 à 30%, voire de 5 ou 10 à 20%.

La forme liquide à administrer comprenant la composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques comprend en outre

au moins un tampon choisi dans le groupe constitué des tampons phosphate, sulfonate (MES, TES, HEPES, MOPS, PIPES, TAPS, TAPSO), acétate, bicine, et/ou

au moins un sel choisi dans le groupe des sels inorganiques (chlorure de sodium, carbonate de calcium, phosphate de sodium ou de potassium), des sels organiques (ex. lactate de sodium, citrate de potassium), et/ou

au moins un surfactant choisi dans le groupe constitué des acides choliques et leurs sels (taurocholate, glycocholate), des phospholipides (non incorporés dans le véhicule lipidique), des lipides (non incorporés dans le véhicule lipidique), des esters de sorbitan (ex. SPAN 85), le sorbitan polyéthoxylé (ex. Tween®80) et/ou

au moins un acide aminé choisi dans le groupe de l'histidine, de la leucine, l'isoleucine, la thréonine, la lysine, la valine, la methionine, la

phenylalanine, leurs mélanges et leurs dérivés, tels que l'acésulfame K ou l'aspartame et leurs mélanges.

Une autre option avantageuse pour la composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques est d'être sous forme d'une poudre sèche pour inhalation et/ou destinée à être administrée à l'aide d'un inhalateur à poudre sèche. Cette composition présentera des propriétés avantageuses de dispersion et d'aérosolisation de la poudre dans l'air, permettant la délivrance de doses adaptées de poudre dans le tractus respiratoire du patient (poudre inhalable). Ces propriétés sont notamment une taille aérodynamique adapté à la voie d'administration. Cette composition permettra de reconstituer les véhicules lipidiques de manière avantageuse dans les fluides physiologiques une fois la poudre déposée dans le tractus respiratoire. Ceci assure en outre que la formulation conserve un maximum d'activité.

De préférence le diamètre géométrique (granulométrie) et/ou la taille aérodynamique pour une administration pulmonaire est inférieur à 5 μm , de préférence est compris entre 0,5 μm et 5 μm , de préférence entre 1 μm et 3 μm .

De préférence le diamètre géométrique (granulométrie) et / ou la taille aérodynamique pour une administration nasale est supérieur à 5 μm , de préférence compris entre 5 μm et 120 μm , de préférence compris entre 10 μm et 60 μm , de préférence compris entre 20 et 40 μm , de préférence entre 20 et 30 μm .

Ainsi, une distribution bimodale de la granulométrie et/ou de taille aérodynamique de la composition pharmaceutique sous forme de poudre pour inhalation est avantageuse et permet une déposition nasale et une déposition pulmonaire par administration nasale.

Dans le contexte de la présente invention, l'on entend de préférence par « taille aérodynamique » un paramètre décrivant le comportement aérodynamique des particules ; ainsi, ce paramètre tient compte de du diamètre géométrique (donc de la granulométrie), mais
5 aussi de la densité et de la forme des particules.

La granulométrie (et le diamètre géométrique) est avantageusement déterminée par diffraction laser. La taille aérodynamique (et le diamètre aérodynamique) est avantageusement déterminée à l'aide d'un test d'impaction (à l'aide d'impacteurs en
10 cascade) décrit dans les pharmacopées (comme la pharmacopée européenne par exemple).

Alternativement ou en outre, la composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'invention est administrée sous forme de poudre sèche
15 et comprend au moins un agent de charge tel qu'un polyol et/ou un alcool de sucre (« sugar alcohol » en anglais) tels que le sorbitol, le mannitol, le maltitol (parfois considéré comme un disaccharide) et le xylitol, des sucres (cristallins) en ce compris les monosaccharides (glucose, arabinose), les disaccharides (lactose, maltose, saccharose, dextrose,
20 tréhalose), et les polysaccharides (dextran, chitosan, amidon, cellulose et ses dérivés), ou encore les oligosaccharides (dextrines, cyclodextrines) et/ou

des sels d'acide gras (ex. stéarate de magnésium) ou des acides gras ou leurs dérivés (ex. esters), tels que l'acide laurique, l'acide
25 palmitique, l'acide stéarique, l'acide érucique, l'acide béhénique, ou un phospholipide (ex. lécitine, phosphatidylcholine phosphatidilglycérol ; de préférence non incorporé dans le véhicule lipidique), des triglycérides (de préférence non incorporées dans le véhicule lipidique), des esters de sucres, et/ou un acide aminé (cfr ci-dessus pour la composition liquide) et

leurs mélanges. Le dextran, le tréhalose, le mannitol et le lactose sont préférés.

Avantageusement, un excipient (agent de charge) sera utilisé, comme le lactose, le tréhalose le sucrose ou le mannitol.

5 Avantageusement, lorsque la composition pharmaceutique est destinée à une administration au patient sous forme de poudre sèche pour inhalation, les excipients ci-dessus comprennent au moins une substance lipidique ou à base d'acide gras (ex. stéarate de magnésium, phospholipide, sucroester). Ceci favorise une bonne homogénéité de
10 mélange et / ou une aérosolisation avantageuse des particules solides. Un autre excipient est également avantageux pour de bonnes propriétés aérodynamiques, comme la leucine.

Il est à noter que certains surfactants comprennent des acides gras, voire des phospholipides ou des triglycérides, qui sont aussi
15 des composants potentiels des véhicules lipidiques de la présente invention. Cependant, ces surfactants ne sont pas incorporés au sein de la structure des véhicules lipidiques et sont avantageusement incorporés à une formulation sèche de ces véhicules lipidiques déjà formés. Dans ce cas, la composition, même sous forme de poudre, comprendra
20 avantageusement un tampon et en plus un ou plusieurs des composés listés ci-dessus, par exemple un surfactant.

Des exemples de méthodes de séchage sont la lyophilisation (« freeze-drying »), l'atomisation par la chaleur (« spray-drying »), le spray-congealing ou spray-chilling, le spray-freeze-drying, le supercritical fluid
25 drying.

Avantageusement, cette composition pharmaceutique est administrable dans le tractus respiratoire, de préférence par nébulisation et/ou par inhalation pressurisée et/ou par inhalation de poudre sèche

et/ou par inhalation à pulvérisation douce (par exemple réalisée au moyen du système Respimat® SofMist).

Un aspect associé de la présente invention est une composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de
5 cellules dendritiques présents dans le tractus respiratoire (telle que décrite ci-dessus), étant dans une tumeur du poumon ou dans une tumeur du système nerveux central.

En outre, selon un autre aspect associé de la présente invention, cette composition pharmaceutique d'activation de
10 macrophages et/ou de cellules dendritiques est particulièrement avantageuse dans le cas d'un cancer métastatique :

- soit la tumeur primaire est située dans le poumon ou le système nerveux central et la composition selon la présente invention stimule l'activité du système
15 immunitaire au niveau des métastases en dehors du poumon ou du système nerveux central (effet abscopal),
- soit la tumeur primaire est située en dehors du poumon ou du système nerveux central et une métastase se retrouve au niveau du poumon ou du système nerveux central : les
20 macrophages y sont activés, et le système immunitaire est ensuite stimulé pour attaquer la tumeur primaire et/ou des métastases en dehors du poumon ou du système nerveux central.

En outre, selon un autre aspect associé de la présente
25 invention, cette composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques est particulièrement avantageuse en combinaison avec d'autres thérapies comme les immunothérapies, de préférence les inhibiteurs des freins immunitaires, de

préférence un anti-PD1, un anti-PD-L1, un anti-CTLA-4 et leurs combinaisons, dans le cancer.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront tirés de la description non limitative qui suit, et en faisant
5 référence aux dessins et aux exemples.

Exemples.-

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des
10 revendications annexées.

Exemple 1. Véhicules lipidiques à base de lécithine de soja

Les inventeurs ont tout d'abord testé un mélange lipidique de lécithine de soja, le cholestérol et DSPE-PEG, dans un ratio molaire lipide lécithine de soja :cholestérol : DSPE-PEG de 8:1 :0.05. En résumé, les lipides
15 ont tout d'abord été pesés dans un récipient, puis mis en solution, ici dans un mélange dichlorométhane :méthanol (50 :50 ; V :V) sous agitation pendant 30 minutes. Lorsque la solubilisation est complète, le solvant est évaporé (rotovapor) à 30°C sous une pression de 16000 Pa pendant 1 heure, menant à la formation du film lipidique. Le film est ensuite soumis à
20 un flux d'air pour retirer les traces de solvant résiduel. Une solution aqueuse (eau ou tampon) est alors ajoutée au film et le mélange est placé sous agitation pendant environ 30 minutes à une température supérieure à la température de transition de phase la plus haute caractérisant les lipides du mélange. La suspension est ensuite extrudée, ici en utilisant le
25 Liposofast LP-50 (4 extrusions à travers de 3 filtres - 1, 0,4 et 0,1 μm , at 600 psi ; donc environ $4,1 \cdot 10^6$ Pa) pour obtenir enfin les véhicules lipidiques.

Les véhicules lipidiques obtenues avaient un diamètre moyen (Dh) de l'ordre de 110 à 150 nm et des indices de polydispersité (Pdl)

d'environ 0,1 à 0,2 ; le potentiel zêta était neutre, à légèrement négatif, en absence de DSPE-PEG et fortement négatif en sa présence (-20 à -35 mV). Pour une mesure de potentiel zêta, l'échantillon a été dilué dans une solution de 0.009% NaCl (masse/volume) de manière à obtenir des valeurs
5 d'atténuateur et de conductivité adaptées à une bonne mesure.

Cette formulation a été reprise pour le piégeage d'un agent pharmaceutique, ici, le 2'3'-cGAMP (cGAMP) avec des efficacités de piégeage (« *entrapment efficiency, EE%* ») de 30 à 45% obtenues. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les compositions impliquant un
10 ratio cGAMP / lipides plus élevé (0,08 mole/mole de lipide). Ces formulations, en plus de présenter des valeurs basses d'EE%, n'ont pas montré d'amélioration d'activation des macrophages THP1-dual (THP1-Dual™ Cells, invivogen #thpd-nfis) *in vitro*.

Exemple 2 – Véhicules lipidiques à base de
15 DOTAP/cholestérol

Les inventeurs ont utilisé un lipide cationique DOTAP (lipide 1 selon la présente invention) avec le cholestérol (lipide 2) à une concentration de respectivement 3.9 mg/mL et 1.4 mg/mL et en y incorporant 100 µg/mL de 2'3'-cGAMP (cGAMP). Ces véhicules ont été
20 préparés en absence (composition 1) ou en présence de DSPE-PEG à 0.05 équivalent moles (par rapport au cholestérol).

Les caractéristiques physiques sont reprises au Tableau ci-dessous :

	Dh (nm)	pdi	Zeta potential (mV)
1	136,5 ± 1,3	0,067 ± 0,015	59,6 ± 2,71
2	128,2 ± 0,76	0,104 ± 0,015	68,3 ± 0,55

En outre, les inventeurs ont obtenu des EE% proche de 100%. Des tests *in vitro* d'activation de macrophages THP1-dual (THP1-Dual™ Cells, invivogen #thpd-nfis) ont montré une efficacité accrue de 4 fois pour les deux compositions, par rapport à la même concentration de cGAMP libre. De même, les inventeurs ont vérifié *in vitro* que les formulations à base de DOTAP/cholestérol protègent mieux le cGAMP de la dégradation enzymatique par l'observation d'une meilleure conservation de l'activation des macrophages THP1-dual après incubation *in vitro* des véhicules lipidiques (vs cGAMP libre) avec l'enzyme ENPP1 humaine recombinante (#6136-EN-010, biotechne, USA).

Bien que l'addition du DSPE ait affecté négativement l'indice de polydispersité pdi, les inventeurs notent que cette addition n'est pas trop problématique.

Exemple 3 – Effet de l'addition du DSPE-PEG

Les inventeurs ont ensuite testé différentes proportions en DSPE-PEG (Figure 1). La composition 2 ci-dessus est conservée. D'autres compositions (3-5) sont développées avec 0,1, 0,5 et 1 équivalent moles en DSPE-PEG. Le taux de charge en cGAMP est alors réduit à partir de 1,88% (composition 2), puis 1,55%, puis 0,94% et enfin 0,60%.

La composition 3 montre des propriétés (diamètre, pdi, % encapsulation) très proches de la composition 2. Le diamètre des particules est réduit à 115 puis 55 nm aux compositions 4-5, alors que le pdi augmente à environ 0.26. Le potentiel zêta chute à presque 0 pour la composition 5. EE% chute à environ 89% puis 62% aux compositions 4-5. La composition 3 permet encore une très bonne activation de macrophages THP1-dual *in vitro*, réduite pour la 4, et l'effet est quasiment totalement perdu pour la 5.

Par contre, les compositions 3 et 4 offrent une meilleure protection du cGAMP face à la dégradation enzymatique par l'observation d'une meilleure conservation de l'activation des macrophages THP1-dual après incubation *in vitro* des véhicules lipidiques (vs cGAMP libre) avec l'enzyme ENPP1 humaine recombinante.

Exemple 4 – fonctionnalisation

Les compositions 2 et 4 (0,05 et 0,5 équivalent moles en DSPE-PEG) ont servi de base, avec remplacement soit de la totalité du DSPE-PEG par le DSPE-PEG-mannose (compositions 6 et 7), soit de la moitié (compositions 8 et 9).

Le diamètre et l'indice pdi augmentent fortement pour la composition 7. L'indice pdi augmente également pour la composition 9. L'EE% reste à chaque fois proche de 100%.

Les inventeurs ont ensuite réalisé un test d'activation de macrophages immunosuppresseurs (type M2) ou des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) LLC1 (Lewis lung carcinoma, ATCC CRL1642) obtenus selon un protocole similaire à celui décrit dans Kwart et al. (Cell Reports 41 (2022) 111769), à partir de macrophages dérivés de moëlle osseuse (BMDMs). La composition 6 montre une activation bien supérieure à la composition 2 sur les deux types de macrophages (M2 et TAMs), comme l'illustre la Figure 2 pour les M2. Les inventeurs ont également observé que la composition 6 administrée par voie endotrachéale à des souris saines induisait une activation des macrophages alvéolaires et des cellules dendritiques.

Exemple 5 – augmentation du taux de charge

Afin d'augmenter le taux de charge en cGAMP dans les véhicules lipidiques, la quantité de DOTAP a été réduite à 1.5 équivalent mole par rapport au cholestérol et de la quantité des 2 lipides a été

réduite à 1/10 par rapport à la composition 1 pour les compositions 10-16. Différentes concentrations de cGAMP ont été testées de 100 (composition 10) à 150, 200, 250, 300, 360, et 720 µg/mL. Le taux de charge augmente de 16,86 (composition 10) à 23,33 ; 28,86 ; 33,65 ; 37,83 ; 42,20 et 59,35%. Le ratio DOTAP/cGAMP diminue de 3,5/1 (composition 10) à 2,35/1 ; 1,76/1 ; 1,4/1 ; 1,2/1, 1/1 et 0,5/1. Le diamètre des particules augmente légèrement jusqu'à la composition 12 (taux charge 28,86%), puis fortement lorsque la concentration en cGAMP est augmentée. Le pdi est constant jusqu'à la composition 12, puis augmente fortement. Réciproquement, le potentiel zêta chute au-delà de la composition 12. L'EE% reste proche de 100% jusqu'à cette composition. L'activation des macrophages THP1 dual reste nettement plus élevée que pour le cGAMP libre.

Partant de la composition 12, l'addition de DPPC au DOTAP (ici, dans un ratio molaire 2:1) est possible, mais le taux de charge en cGAMP est réduit. L'activation des macrophages THP1 dual reste nettement plus élevée que pour le cGAMP libre, mais réduite de moitié aux faibles concentrations en cGAMP. Cependant, ce genre de formulation est intéressante car elle est associée à une rigidité accrue (aussi reflétée par une Tm de la série de lipides accrue), ce qui est utile dans certains modes d'administration.

Exemple 6 : amélioration des propriétés de rigidité des formulations

Les inventeurs ont observé un relargage instantané du cGAMP piégé dans des compositions lorsque ces formulations étaient diluées dans un grand volume de PBS. Afin de surmonter cette limite, les inventeurs ont préparé des nouvelles formulations en rajoutant un excipient avec une Tm plus élevée (DPPC). Partant de la composition 12, le DPPC a été ajouté à 3, 5, 8 et 10 équivalent mole par rapport au

cholestérol pour les compositions 13, 14, 15 et 16, respectivement. Les résultats ont démontré que l'augmentation de la quantité du DPPC diminue la fraction de cGAMP relargué instantanément après une dilution 200X dans du PBS. Compositions 12, 13, 14, 15 et 16 : 100% ; 59.48 ; 69.57 ; 47.83 ; 32.18%.

Exemple 7– utilisation d'un lipide ionisable

Partant de la composition 14, les inventeurs ont remplacés le DOTAP par le DODMA dans les mêmes proportions molaires. Le protocole de préparation des véhicules lipidiques décrits plus hauts a été adapté de sorte que le tampon de réhydratation du film lipidique était un tampon acétate 0.01M à pH 5.0 de manière à ioniser le DODMA et ainsi favoriser le piégeage du cGAMP. L'EE% était semblable à celui obtenu pour la condition 14.

Exemple 8– combinaison d'une composition avec un traitement standard

Une composition de la présente invention a été administrée par voie endotrachéale en combinaison avec un anticorps monoclonal anti-PD1 (clone RPM1-14 #BP0146, BioXcell) à des souris porteuses de tumeurs pulmonaires. La combinaison de traitement a mené à une activité supérieure aux monothérapies correspondantes.

REVENDEICATIONS

1. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques comprenant

des véhicules lipidiques formés d'une série de lipides avec au moins un
5 lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206), lesdits véhicules lipidiques étant choisis dans le groupe constitué des liposomes, des vésicules, des micelles, des lipoplexes, des émulsions lipidiques, des nanocristaux lipidiques, des microsphères lipidiques, des nanoparticules lipidiques, et de leurs mélanges,

10 lesdits véhicules lipidiques comprenant un agent pharmaceutique choisi dans le groupe constitué de

- un acide nucléique,
- un agoniste de la protéine STING ou un antagoniste de la protéine STING,
- 15 - un ligand des récepteurs de type Toll,
- un immunomodulant, un peptide, ou
- un mélange de ceux-ci.

2. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon la revendication 1,
20 dans laquelle la série de lipides formant les véhicules lipidiques présente une température de transition de phase (T_m) comprise entre 10°C et 80°C, de préférence entre 20°C et 60°C.

3. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon la revendication 1 ou
25 2 étant pour inhalation.

4. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les véhicules lipidiques sont

des nanoparticules lipidiques (LNPs), de préférence des liposomes ou des nanoparticules lipidiques solides (SLN) ou des transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC).

5 5. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle l'agent pharmaceutique présente une charge globale négative.

10 6. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la série de lipides comprend un premier lipide étant cationique et/ou ionisable.

15 7. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon la revendication 6, dans laquelle les véhicules lipidiques présentent une proportion molaire dudit lipide cationique et/ou ionisable par rapport à l'agent pharmaceutique comprise entre 30 et 0,1, de préférence entre 10 et 0,2, avantageusement entre 3 et 0,5, de préférence entre 2,5 et 0,8, préférentiellement entre 2,4 et 1.

20 8. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon la revendication 6 ou 7, dans laquelle la série de lipides comprend un second lipide choisi dans le groupe des stérols, un phospholipide, un triglycéride, un diglycéride, un glycérophospholipide et une sphingomyéline, de préférence un stérol ou un phospholipide, de manière très préférée un stérol.

25 9. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon la revendication 8, dans laquelle les véhicules lipidiques présentent un rapport molaire du premier lipide au deuxième lipide compris entre 0,3 et 20, de préférence entre 0,5 et 10, de préférence entre 1 et 5 (moles du premier lipide : moles

du second lipide), ledit second lipide étant de préférence un stérol, tel que le cholestérol et/ou un phospholipide comme le DPPC et/ou le DSPC.

10. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit au moins un lipide
5 présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) est un phospholipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206), de préférence un phospholipide-PEG présentant une fonctionnalisation par un ligand du
10 récepteur au mannose (CD206), avantageusement un DSPE-PEG présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206).

11. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit ligand du récepteur au
15 mannose (CD206) est choisi dans le groupe comprenant un mannose, un fucose, une N-acétylglucosamine, une N-acétylgalactosamine, une glycoprotéine, un galactocomannane, un α -D-mannopyranoside, un polymannose, un anticorps anti-CD206, et leurs mélanges.

20 12. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les véhicules lipidiques présentent une proportion molaire dudit au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) aux
25 lipides totaux comprise entre 0,01 à 0,2, de préférence comprise entre 0,02 et 0,1, de préférence entre 0,03 et 0,05.

13. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les véhicules lipidiques
30 présentent une proportion molaire dudit au moins un agent

pharmaceutique par rapport audit au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206) comprise entre 5 et 150.

14. Composition pharmaceutique d'activation de
5 macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit agent pharmaceutique est présent dans un taux de charge compris entre 0,1 et 80% par rapport à la masse des véhicules lipidiques, de préférence entre 1 et 70%, de préférence entre 10 et 60%, de préférence entre 15 et 50%, tel qu'entre
10 20 et 40% ou encore entre 25 et 30%.

15. Composition pharmaceutique d'activation de
macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les véhicules lipidiques présentent une taille moyenne, mesurée par diffusion de la lumière
15 dynamique (DLS), comprise entre 50 et 200 nm, de préférence comprise entre 60 et 190 nm, avantageusement comprise entre 70 et 180 nm, préférentiellement comprise entre 80 et 180 nm, de manière préférée comprise entre 90 et 180 nm, de manière plus préférée comprise entre 100 et 180 nm, de préférence comprise entre 110 et 180 nm,
20 avantageusement comprise entre 120 et 180 nm, préférentiellement comprise entre 120 et 170 nm, de manière préférée comprise entre 120 et 160 nm.

16. Composition pharmaceutique d'activation de
macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des
25 revendications précédentes 1 à 14, dans laquelle les véhicules lipidiques présentent une taille moyenne, mesurée par diffusion de la lumière dynamique (DLS), comprise entre 350 et 1500 nm, de préférence entre 350 et 1400 nm, avantageusement entre 350 et 1300 nm, préférentiellement entre 350 et 1200 nm, avantageusement entre 350 et 1100 nm,
30 préférentiellement entre 350 et 1000 nm, de préférence entre 350 et 900

nm, de manière préférée entre 350 et 800 nm, plus particulièrement entre 350 et 700 nm, de manière avantageuse entre 350 et 600 nm, par exemple entre 400 et 600 nm.

17. Composition pharmaceutique d'activation de
5 macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant en outre un ion métallique, de préférence choisi parmi le Mn^{2+} , le Co^{2+} ou le Zn^{2+} , et/ou à une teneur d'au moins 10 PPM.

18. Composition pharmaceutique d'activation des
10 macrophage et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les véhicules lipidiques présentent un indice de polydispersité compris entre 0,05 et 0,9, de préférence compris entre 0.1 et 0.8, avantageusement compris entre 0.2 et 0.75, préférentiellement compris entre 0.3 et 0.7, de manière préférée
15 comprise entre 0.4 et 0.6 mesuré par diffusion de la lumière dynamique (DLS), de préférence cet indice de polydispersité étant défini par la formule :

$$PI = 2 \bar{x}_{DLS}^2 \frac{\sum_{i=1}^N \Delta Q_{int,i} (1/x_i^2 - 1/\bar{x}_{DLS}^2)}{\sum_{i=1}^N \Delta Q_{int,i}}$$

où $\bar{x}_{DLS}$ est la moyenne du diamètre des particules, $\Delta Q_{int,i}$ la quantité
20 de particules avec une taille X_i et x_i étant le diamètre de la particule sphérique.

19. Composition pharmaceutique d'activation de
macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les véhicules lipidiques
25 présentent un potentiel zêta compris entre -60 mV et 100 mV, de préférence entre -40 mV et 80mV, avantageusement entre -20 mV et 60 mV, préférentiellement entre 0 mV et 50mV, de préférence entre 10 mV

et 40 mV, avantageusement entre 10 mV et 30 mV, de préférence mesuré par laser doppler electrophoresis, de préférence dans une solution aqueuse de NaCl à 0,009% (masse :volume).

5 20. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes étant sous forme sèche, de préférence destinée à être dissoute ou redispersée dans un solvant aqueux physiologique, ou à être administrée à l'aide un inhalateur à poudre sèche.

10 21. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 19 comprenant de 50 à 98% d'eau (masse de l'eau : masse totale de la composition), de préférence de 70 à 95% d'eau, voire de 80 à 90% d'eau.

15 22. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant en outre

un tampon choisi dans le groupe comprenant les tampons phosphate, sulfonate (MES, TES, HEPES, MOPS, PIPES, TAPS, TAPSO), acétate, bicine,
20 et/ou

au moins un sel choisi dans le groupe des sels inorganiques et des sels organiques, et/ou

au moins un surfactant choisi dans le groupe constitué des

acides choliques et leurs sels,

25 phospholipides (ex. les phosphatidylcholines ou lécithine, les phosphatidylglycerols),

lipides ou triglycérides,

esters de sorbitan, les sorbitans polyéthoxylés,

acides gras, de préférence l'acide laurique, palmitique, stéarique, érucique ou béhénique, des esters de ces acide gras, ou des dérivés de ces acides gras, tels que des sels, de préférence choisis parmi le stéarate de magnésium, le sodium stéaryl fumarate et le sodium stéaryl lactylate,
5 sodium lauryl sulfate, magnesium lauryl sulfate,

surfactants pulmonaires naturels ; et

sucroesters (sugar esters, par exemple des esters entre le sucrose ou le glucose et des acide gras) et/ou

un sucre, de préférence choisi dans le groupe des monosaccharides (tels
10 que le glucose ou l'arabinose), des disaccharides (tels que le lactose, le maltose, le saccharose, le dextrose, le trehalose, le maltitol et leurs mélanges ou un agent de charge choisi parmi les polyols tels que le sorbitol, le mannitol et le xylitol), des polysaccharides (tels que le dextran, le chitosan, l'amidon, la cellulose, and ses dérivés), des oligosaccharides
15 (tels que la cyclodextrine et les dextrines), et/ou

au moins un acide aminé choisi dans le groupe constitué de l'histidine, de la leucine, l'isoleucine, la thréonine, la lysine, la valine, la methionine, la phenylalanine, leurs mélanges et leurs dérivés, tels que l'acésulfame K ou l'aspartame.

20 23. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon une quelconque des revendications précédentes étant administrable par nébulisation et/ou par inhalation pressurisée et/ou par inhalation de poudre sèche et/ou par inhalation à pulvérisation douce.

25 24. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon l'une quelconque des revendications précédentes étant pour le traitement d'un cancer, de préférence un cancer métastatique, de préférence ladite métastase étant en-dehors du poumon ou du système nerveux central et la tumeur

primaire étant pulmonaire ou localisée au niveau du système nerveux central, ou ladite métastase étant pulmonaire ou localisée au niveau du système nerveux central et la tumeur primaire étant en-dehors du poumon ou du système nerveux central.

5 25. Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques selon une quelconque des revendications précédentes 1 à 23 étant pour le traitement d'une maladie infectieuse au niveau du tractus respiratoire et / ou systémique, ou du système nerveux central.

10 26. Composition pharmaceutique selon une quelconque des revendications précédentes 1 à 23 comprenant un acide nucléique encodant un ou plusieurs épitope(s), ou un peptide comprenant un ou plusieurs épitopes, ladite composition pharmaceutique étant pour la vaccination.

15 27. Procédé pour l'obtention de la composition pharmaceutique d'activation des macrophages et/ou de cellules dendritiques selon une quelconque des revendications précédentes comprenant les étapes

- 20 - de solubilisation des lipides dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques,
- d'évaporation du solvant de manière à former un film lipidique,
- de réhydratation avec une solution contenant l'agent pharmaceutique,
- 25 - d'extrusion et d'insertion d'un lipide dérivatisé avec un ligand du récepteur CD206,
- de préférence une seconde étape de mise en contact d'une solution contenant l'agent pharmaceutique avec les lipides extrudés,

lesdits lipides comprenant un lipide neutre à pH 7,0 et chargé positivement à pH 5, et ladite étape de rehydratation étant pratiquée à pH inférieur à 7,0.

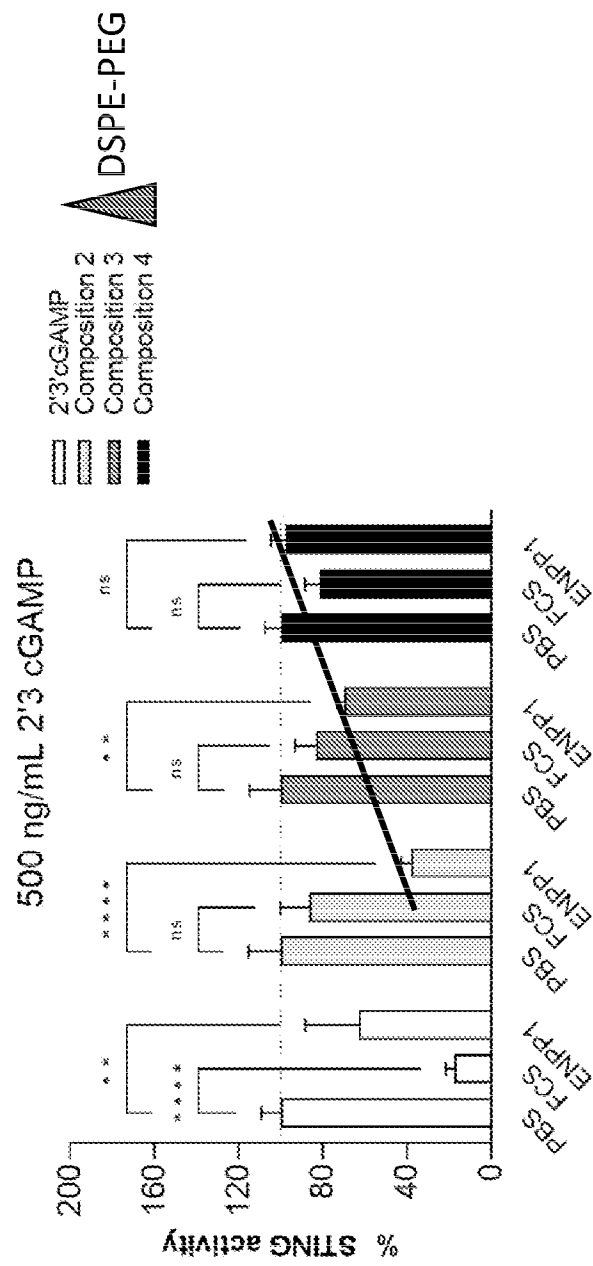


FIG. 1

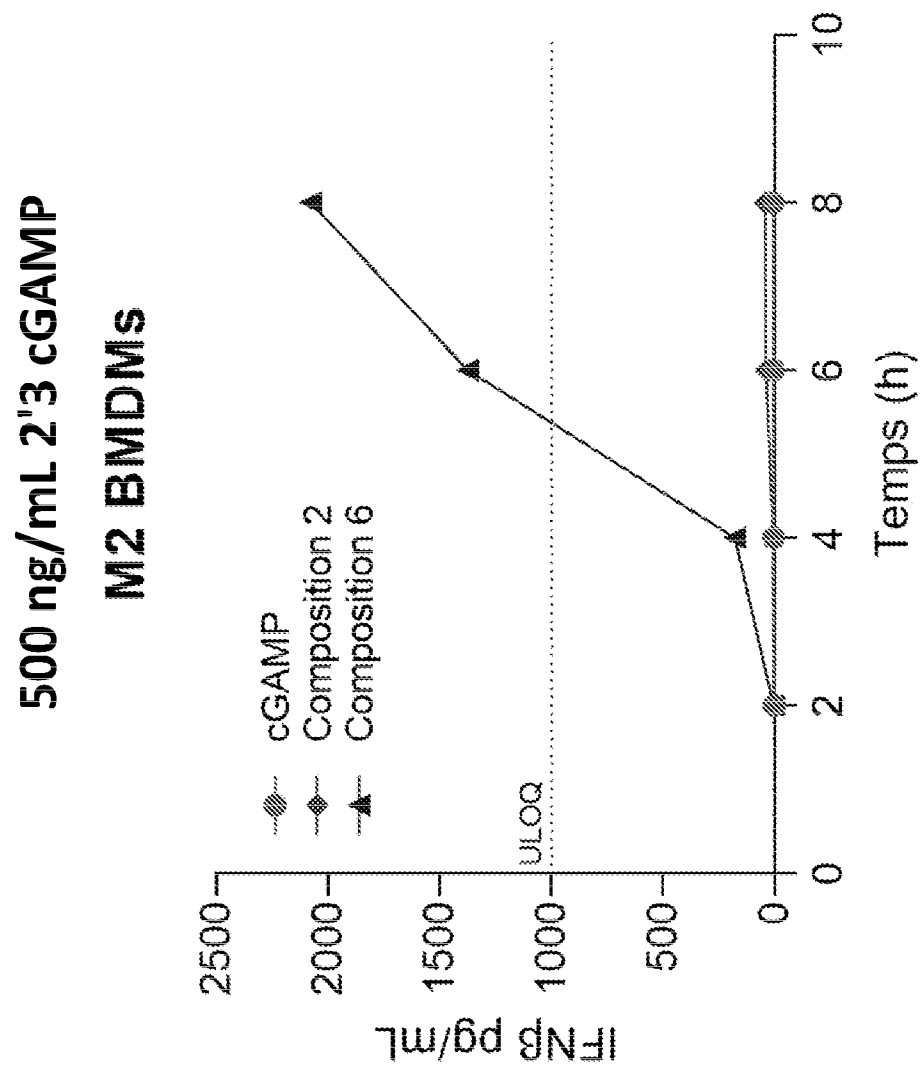


FIG. 2

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE PAT-20518-BE00
Demande nationale belge n° 202305457	Date du dépôt 02-06-2023
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) INHATARGET THERAPEUTICS	
Date de la requête d'une recherche de type international 15-07-2023	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN84272
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. ☐ IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDECTIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. ☐ ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202305457

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV.	A61K9/00	A61K9/12
	A61K47/69	A61K31/7084
	A61K9/51	A61P11/00
	A61K47/24	A61P35/00
	A61K47/28	
ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)		
A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2023/092151 A1 (OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION [US]) 25 mai 2023 (2023-05-25) * revendications 26-41 * * page 18, ligne 12 - ligne 25 * ----- -/--	1-27
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée		Date d'expédition du rapport de recherche de type international
24 novembre 2023		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Lemarchand, Aude

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ZHUANG XINYU ET AL: "mRNA Vaccines Encoding the HA Protein of Influenza A H1N1 Virus Delivered by Cationic Lipid Nanoparticles Induce Protective Immune Responses in Mice", VACCINES, vol. 8, no. 1, 10 mars 2020 (2020-03-10), page 123, XP055941881, DOI: 10.3390/vaccines8010123 * abrégé * * page 4/17, alinéa 2.7. * * page 8/17; figures 2(d), (e) * * first sentence; page 12/17 * -----	1-27
X	KIM M. ET AL: "Engineered ionizable lipid nanoparticles for targeted delivery of RNA therapeutics into different types of cells in the liver", SCIENCE ADVANCES, vol. 7, no. 9, 26 février 2021 (2021-02-26), XP093103017, US ISSN: 2375-2548, DOI: 10.1126/sciadv.abf4398 Extrait de l'Internet: URL:https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abf4398> * abrégé * * figures 6-8 * * page 11/12, colonne de gauche, alinéa second * * page 10/12, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa first * * page 8/12, colonne de gauche * -----	1-27
X	ES 2 698 565 A1 (UNIV MADRID COMPLUTENSE [ES] ET AL.) 5 février 2019 (2019-02-05) * revendications * * exemples * ----- -/--	1-27

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SHARMA RAJEEV ET AL: "Development, characterization and ex vivo assessment of lipid-polymer based nanocomposite(s) as a potential carrier for site-specific delivery of immunogenic molecules", JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 51, 1 juin 2019 (2019-06-01), pages 310-319, XP093103067, FR ISSN: 1773-2247, DOI: 10.1016/j.jddst.2019.03.027 Extrait de l'Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224719301753/pdf?md5=7a56b75587c627ba06865529900e8d7f&pid=1-s2.0-S1773224719301753-main.pdf> * Scheme 2; page 313 * * abrégé * * page 315; figure 3 * -----	1, 2, 4, 6, 8, 10-27
X	YUHUA WANG ET AL: "mRNA Vaccine with Antigen-Specific Checkpoint Blockade Induces an Enhanced Immune Response against Established Melanoma", MOLECULAR THERAPY, vol. 26, no. 2, 1 février 2018 (2018-02-01), pages 420-434, XP055614107, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.11.009 * abrégé * * page 430, colonne de droite, alinéa 2 * * figure 2 * -----	1-27
X	ZHANG LINHUA ET AL: "Targeted Codelivery of an Antigen and Dual Agonists by Hybrid Nanoparticles for Enhanced Cancer Immunotherapy", NANO LETTERS, vol. 19, no. 7, 10 juillet 2019 (2019-07-10), pages 4237-4249, XP093103078, US ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b00030 * abrégé * * figure 1 * * tableau 1 * ----- -/--	1-27

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHOI EUN SEO ET AL: "Mannose-Modified Serum Exosomes for the Elevated Uptake to Murine Dendritic Cells and Lymphatic Accumulation", MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, 29 mai 2019 (2019-05-29), page 1900042, XP093078839, DE ISSN: 1616-5187, DOI: 10.1002/mabi.201900042 Extrait de l'Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/mabi.201900042> * abrégé * * figures 1, 4b *	1-27
X	WO 2018/140826 A1 (METHODIST HOSPITAL [US]) 2 août 2018 (2018-08-02) * alinéa [0208] * * alinéa [0089] * * exemples *	1-27
X	EP 3 845 249 A1 (CHENGDU RIBOCURE PHARMATECH COMPANY LTD [CN]) 7 juillet 2021 (2021-07-07) * revendications * * Formulations 22-25; exemples *	1-27
X	LI KESANG ET AL: "The lipid platform increases the activity of STING agonists to synergize checkpoint blockade therapy against melanoma", BIOMATERIALS SCIENCE, vol. 9, no. 3, 9 février 2021 (2021-02-09), pages 765-773, XP093105102, GB ISSN: 2047-4830, DOI: 10.1039/D0BM00870B * page 766, alinéa 2.4 * * figure 1 * * abrégé *	1-27

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202305457

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2023092151	A1	25-05-2023	AUCUN
ES 2698565	A1	05-02-2019	AUCUN
WO 2018140826	A1	02-08-2018	AU 2018212887 A1 08-08-2019
		CA 3051136 A1 02-08-2018	
		CN 109152830 A 04-01-2019	
		CN 115845040 A 28-03-2023	
		DK 3573656 T3 14-03-2022	
		EP 3573656 A1 04-12-2019	
		EP 4008344 A1 08-06-2022	
		ES 2905591 T3 11-04-2022	
		JP 7181880 B2 01-12-2022	
		JP 2020505403 A 20-02-2020	
		JP 2023015346 A 31-01-2023	
		KR 20190108150 A 23-09-2019	
		SG 11201906744V A 27-08-2019	
		US 2018360756 A1 20-12-2018	
		US 2022305103 A1 29-09-2022	
		WO 2018140826 A1 02-08-2018	
EP 3845249	A1	07-07-2021	CN 110522917 A 03-12-2019
			CN 110522918 A 03-12-2019
			CN 110522919 A 03-12-2019
			CN 112292154 A 29-01-2021
			EP 3845249 A1 07-07-2021
			JP 2021525277 A 24-09-2021
			US 2021196832 A1 01-07-2021
			WO 2019223728 A1 28-11-2019



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN84272	Date du dépôt(jour/mois/année) 02.06.2023	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE202305457
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K9/00 A61K9/12 A61K9/51 A61K47/24 A61K47/28 A61K47/69 A61K31/7084 A61P11/00 A61P35/00			
Déposant INHATARGET THERAPEUTICS			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Juillet 2022)	Examineur Lemarchand, Aude
--	-------------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE202305457

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée sur la base d'un listage des séquences
 - a. ☐ faisant partie de la demande telle que déposée.
 - b. ☐ remis postérieurement à la date du dépôt aux fins de la recherche,
☐ accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée.
3. ☐ En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée dans la mesure où une opinion valable pouvait être formulée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	5, 17, 20, 21, 23, 27
	Non :	Revendications	1-4, 6-16, 18, 19, 22, 24-26
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-27
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-27
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

1. État de la technique

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure. Les passages pertinents sont ceux identifiés dans le rapport de recherche sauf précision contraire.

- D1 WO 2023/092151 A1 (OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION [US]) 25 mai 2023 (2023-05-25)
- D2 ZHUANG XINYU ET AL: "mRNA Vaccines Encoding the HA Protein of Influenza A H1N1 Virus Delivered by Cationic Lipid Nanoparticles Induce Protective Immune Responses in Mice",
VACCINES,
vol. 8, no. 1, 10 mars 2020 (2020-03-10), page 123, XP055941881,
DOI: 10.3390/vaccines8010123
- D3 KIM M. ET AL: "Engineered ionizable lipid nanoparticles for targeted delivery of RNA therapeutics into different types of cells in the liver",
SCIENCE ADVANCES,
vol. 7, no. 9, 26 février 2021 (2021-02-26), XP093103017,
US
ISSN: 2375-2548, DOI: 10.1126/sciadv.abf4398
Extrait de l'Internet:
URL:<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abf4398>
- D4 ES 2 698 565 A1 (UNIV MADRID COMPLUTENSE [ES] ET AL.) 5 février 2019 (2019-02-05)
- D5 SHARMA RAJEEV ET AL: "Development, characterization and ex vivo assessment of lipid-polymer based nanocomposite(s) as a potential carrier for site-specific delivery of immunogenic molecules",
JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY,
vol. 51, 1 juin 2019 (2019-06-01), pages 310-319, XP093103067,
FR
ISSN: 1773-2247, DOI: 10.1016/j.jddst.2019.03.027
Extrait de l'Internet:
URL:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224719301753/pdf?md5=7a56b75587c627ba06865529900e8d7f&pid=1-s2.0-S1773224719301753-main.pdf>

- D6 YUHUA WANG ET AL: "mRNA Vaccine with Antigen-Specific Checkpoint Blockade Induces an Enhanced Immune Response against Established Melanoma",
MOLECULAR THERAPY,
vol. 26, no. 2, 1 février 2018 (2018-02-01), pages 420-434, XP055614107,
US
ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.11.009
- D7 ZHANG LINHUA ET AL: "Targeted Codelivery of an Antigen and Dual Agonists by Hybrid Nanoparticles for Enhanced Cancer Immunotherapy",
NANO LETTERS,
vol. 19, no. 7, 10 juillet 2019 (2019-07-10), pages 4237-4249,
XP093103078,
US
ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b00030
- D8 CHOI EUN SEO ET AL: "Mannose-Modified Serum Exosomes for the Elevated Uptake to Murine Dendritic Cells and Lymphatic Accumulation",
MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, 29 mai 2019 (2019-05-29), page
1900042, XP093078839,
DE
ISSN: 1616-5187, DOI: 10.1002/mabi.201900042
Extrait de l'Internet:
URL:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/mabi.201900042>
- D9 WO 2018/140826 A1 (METHODIST HOSPITAL [US]) 2 août 2018
(2018-08-02)
- D10 EP 3 845 249 A1 (CHENGDU RIBOCURE PHARMATECH COMPANY LTD [CN]) 7 juillet 2021 (2021-07-07)
- D11 LI KESANG ET AL: "The lipid platform increases the activity of STING agonists to synergize checkpoint blockade therapy against melanoma",
BIOMATERIALS SCIENCE,
vol. 9, no. 3, 9 février 2021 (2021-02-09), pages 765-773, XP093105102,
GB
ISSN: 2047-4830, DOI: 10.1039/D0BM00870B

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

L'opinion qui suit a été élaborée en interprétant les revendications au sens le plus large possible compte-tenu des objections de clarté indiquées dans le point VIII. En particulier, le terme "Composition pharmaceutique d'activation de macrophages et/ou de cellules dendritiques" a été interprété comme couvrant toute composition pharmaceutique "per se" susceptible d'avoir cette propriété.

2. Nouveauté

2.1. Le document D1 décrit une composition pharmaceutique comprenant des véhicules lipidiques formés d'une série de lipides avec au moins un lipide présentant une fonctionnalisation par un ligand du récepteur au mannose (CD206), ledit véhicule lipidiques étant une nanoparticule lipidique comprenant un agent pharmaceutique de type acide nucléique. Les nanoparticules lipidiques marquées au mannose (Man-LNP) décrites dans D1 sont formées à partir d'un mélange lipidique comprenant un ou plusieurs lipides comprenant un agent de ciblage microglial (par exemple, Man-PEG-DSPE) ; un ou plusieurs lipides ionisables, un ou plusieurs lipides cationiques, ou une combinaison de ceux-ci (par exemple, DLin-MC3-DMA) ; un ou plusieurs lipides neutres (DSPC, cholestérol, ou une combinaison de ceux-ci), et un ou plusieurs lipides PEGylés (PEG-DMG). Ils peuvent être synthétisés par auto-assemblage microfluidique et caractérisés par la taille des particules, le potentiel zêta, le pourcentage d'encapsulation de l'antagomir et l'efficacité et la sélectivité de la modulation de la cible (voir revendications 1-2, 26-41, page 8, ligne 24; page 13, lignes 20-24; page 36, lignes 10-12; page 40, lignes 25-31). La composition pharmaceutique peut être administrée par inhalation (page 8, ligne 24). La taille des particules est comprise entre 50-750 nm et ont un index de polydispersité inférieur à 0,4 (page 13, lignes 20-24).

L'objet des revendications 1-4, 6-8, 10, 11, 15, 16, 18, 22 est ainsi anticipé par D1.

2.2. Le document D2 décrit la préparation de nanoparticules à base de lipides cationiques modifiées avec du mannose et comprenant un vaccin ARN messager pour traiter le virus de la grippe A H1N1 par administration intranasale. La préparation des nanoparticules lipidiques modifiées au mannose et chargées en acide nucléique est décrite au point 2.7. Les caractéristiques de ces particules (taille, potentiel zeta) est divulgué en figure 2d et 2e. Référence est faite aux passages mentionnés dans le rapport de recherche.

L'objet des revendications 1-4, 6-16, 19, 22, 25, 26 est ainsi anticipé par D2.

2.3. Le document D3 décrit la préparation de nanoparticules lipidiques ionisables conçues pour la délivrance ciblée de thérapies ARN dans différents types de cellules du foie. Des nanoparticules fonctionnalisées au mannose pour délivrer le siARN ont été préparées. Le rapport molaire lipides ionisables:DSPC:cholestérol:PEG-lipides est de 42,5:13:42,5:3. Le mannose-PEG a été ajouté à la formulation dans une proportion de 0,5 à 2,5 %.

2.4. Le document D4 décrit la préparation de nanoparticules lipidiques ayant pour cellules cibles des macrophages cérébraux et comprenant un noyau formé par un acide nucléique et un lipide cationique biocompatible, une couronne formée par un phospholipide insaturé et du cholestérol, et un composant à base de lipide pégylé et fonctionnalisé par un dérivé de mannose. Le document D4 décrit son procédé de préparation, et son utilisation dans le traitement de maladies cérébrales.

Le document D4 décrit aussi un procédé de production de nanoparticules lipidiques comprenant les étapes suivantes :

1a. complexation d'un acide nucléique dissous dans l'eau avec un lipide cationique biocompatible dans le chloroforme pour former des micelles inverses par la formation d'une monophase de Bligh & Dyer par l'ajout de méthanol jusqu'à l'homogénéisation ;

2a. déstabilisation de la monophase de Bligh & Dyer et concentration des particules hydrophobes de l'étape 1a par addition de chloroforme et d'eau ;

1b. préparation des lipides bicouches : phospholipide insaturé, cholestérol/lipide-PEG-MAN, y compris la mannosylation du composant lipide-PEG-NHS par réaction directe de la tête de l'ester de succinimidyle (NHS) avec le groupe -NH₂ du p-aminophényl- α -D mannopyranoside (MAN) ;

2b. préparation d'un film lipidique avec les lipides de l'étape 1b ;

3. insertion du film lipidique de l'étape 2b dans la phase organique de l'étape 2a par dissolution ;

4. interaction des micelles inverses avec les lipides formant la bicouche, tous deux présents dans la solution de l'étape 3, induite par l'ajout d'eau à la phase organique ;

5. élimination du solvant organique et obtention des nanoparticules lipidiques multilamellaires en solution aqueuse.

L'objet des revendications 1, 2, 4, 6-16, 18, 19, 22 est ainsi anticipé par D4.

2.5. Le document D5 décrit des nanocomposites à base de lipides fonctionnalisés au mannose (DSPE-PEG2000-Mannose), PLGA, lécithine de soja pour l'administration spécifique d'une molécule immunogène (schéma 2). Les nanocomposites servent de

véhicules lipidiques capable de cibler et délivrer des molécules immunogènes (peptides et protéines). Ces formulations sont développées comme vaccins thérapeutiques basés sur des nanotechnologies.

L'objet des revendications 1, 2, 4, 6, 8, 10-11, 15-16, 18, 19, 22 et 26 est ainsi anticipé par D5.

2.6. Le document D6 décrit un vaccin préclinique contre le cancer qui introduit simultanément un antigène ARNm et un siARN bloquant le point de contrôle immunitaire dans les cellules présentatrices d'antigènes. Pour ce faire, les deux immunothérapies à base d'acide nucléique ont été formulées dans une nanoparticule (NP) de phosphate de calcium enrobée de lipides servant de vecteur. Les NP lipidiques pégylées ont été fonctionnalisées avec du mannose comme ligand de ciblage pour faciliter l'absorption préférentielle par les cellules dendritiques (DC) dans les ganglions lymphatiques après administration sous-cutanée.

D6 anticipe l'objet des revendications 1-2, 4, 6, 8, 10-11, 22, 24, 26.

2.7. Le document D7 décrit un traitement du cancer par immunothérapie impliquant le ciblage des cellules dendritiques en utilisant des nanoparticules hybrides lipide-polymère à base d'imiquimod (IMQ, un agoniste du récepteur toll-like, TLR 7/8), du MPLA (un agoniste du TLR4). Les particules hybrides contiennent du PCL-PEG-PCL, du DOTAP, et du DSPE-PEG-mannose (MAN-IMNPS) (voir entre autre figure 1, tableau 1 et abrégé).

D7 anticipe l'objet des revendications 1-2, 4, 6-12, 15-16, 18-19, 22, 24, 26.

2.8. Le document D8 décrit la préparation d'exosomes modifiés en surface par un PEG fonctionnalisé au mannose en tant que vecteur de stimulateurs immunitaires et d'antigènes dans les ganglions lymphatiques pour les vaccins et l'immunothérapie du cancer.

D8 anticipe l'objet des revendications 1-2, 4, 6, 8, 10-11, 15-16, 22, 24, 26.

2.9. Le document D9 décrit la préparation de particules de vaccin ARNm ciblé qui contient du mannose à la surface de l'enveloppe lipidique. Ces particules se lient aux cellules dendritiques qui expriment un récepteur de mannose avec une grande affinité de liaison. La composition lipidique de l'enveloppe est la suivante : 49 % EDOPC, 49 % DOPE, 1 % DSPE-PEG et 1 % DSPE-PEG-mannose. Les particules de vaccin ARNm ciblées ont une taille comprise entre 40 et 200 nm. Les vaccins à ARNm visent à traiter le cancer, entre autre celui du poumon. Ils peuvent être administrés par inhalation.

D9 anticipe l'objet des revendications 1-4, 6-16, 22, 24, 26.

2.10. Le document D10 décrit la préparation d'une nano-formulation ciblée modifiée au mannose utilisée par exemple pour l'administration de vaccins, la thérapie ciblée sur les tumeurs. Les formulations 22-24 sont préparées à partir de DOTAP, DSPE-PEG2000, PLGA, Chol, Mannose-PEG1000-Chol, ApoA-I et comme un principe actif comprenant de l'ARNsi.

D10 anticipe l'objet des revendications 1, 2, 4, 6-14, 22, 24, 26.

2.11. Le document D11 décrit la préparation formulations contenant du cGAMP complexé avec de la protamine encapsulés dans des nanoparticules lipidiques à base de DOTAP, de cholestérol et de DSPE-PEG-mannose pour une administration spécifique ciblant les cellules dendritiques. Ces particules sont utilisées dans le traitement de mélanomes.

D11 anticipe l'objet des revendications 1, 2, 4, 6-16, 19, 22, 24, 26.

2.12. Par ailleurs, vue la définition des revendications 2, 15-16, 18 et 19 en utilisant des paramètres, tous les documents ci-dessus sont opposables à la nouveauté de ces revendications.

2.13. Aucun des documents cités ci-dessus ne semble anticiper l'objet des revendications 5, 17, 20, 21, 23, 27.

3. Activité inventive

3.1. N'étant pas nouvelles, l'objet des revendications 1-4, 6-16, 18-19, 22, 24-26 ne peut être considéré comme étant inventif vis à vis de chacun des documents cités D1-D11 et pris séparément comme état de la technique le plus proche.

3.2. Aucune activité inventive ne peut-être attribuée partant par exemple de D1 comme état de la technique le plus proche pour l'objet de la revendication 5. Aucun effet ne semble lié à la charge globale de l'agent pharmaceutique qui paraît être définie de façon arbitraire et qui est l'une des possibilités évidentes pour l'homme du métier.

3.3. Aucune activité inventive ne peut-être attribuée partant par exemple de D1 comme état de la technique le plus proche pour l'objet de la revendication 17. Aucun effet technique ne semble lié à l'ajout d'ion métallique dans la composition pharmaceutique. Ainsi l'objet de la revendication 17 est l'une des possibilités évidentes pour l'homme du métier confronté au problème de fournir une composition alternative.

3.4. Aucune activité inventive ne peut-être attribuée partant par exemple de D2 comme état de la technique le plus proche pour l'objet des revendications 20-21 et 23. Aucun effet technique ne semble lié au type de composition pour inhalation utilisée dans la

composition pharmaceutique. Ainsi l'objet de la revendications 20-21, 23 est l'une des possibilités évidentes pour l'homme du métier confronté au problème de fournir une composition alternative pour administration par voie nasale et pour inhalation.

3.5. Concernant l'objet de la revendication 27, D2, point 2.7. semble l'état de la technique le plus proche. La différence avec les procédés décrits dans D2 est le pH de l'étape de réhydratation qui est de 7.4 (HEPES 10mM) alors que celui de la demande est inférieur à 7.

Il n'y a aucun effet du changement de pH vis à vis de D2. Il semble par ailleurs qu'il n'y ait aucun effet qui soit valide pour la préparation de tous les véhicules lipidiques et tous les principes actifs revendiqués.

Ainsi le pH est une caractéristique qui a été choisi de façon arbitraire. L'homme du métier confronté au problème de fournir un procédé alternatif envisagerait entre autre celui couvert par la revendication 27 par des modifications de routine. Aucune activité inventive ne peut-être reconnue.

Il convient de noter qu'on arrive à la même conclusion en choisissant le procédé de D4 comme état de la technique le plus proche.

3.6 Dans le cas présent, même si les revendications étaient restreintes à l'objet des exemples, aucune activité inventive ne pourrait être reconnue vis à vis de D11.

Par ailleurs, compte-tenu du nombre de compositions dont la protection est recherchée et vu que l'exposé de l'invention est restreint à une unique composition contenant du cGAMP, il n'apparaît pas plausible que toutes les compositions couvertes par la revendication 1 induisent le même effet, que ce soit un effet en thérapie, des propriétés particulières des compositions préparées, un mode de préparation spécifique ou un mode d'administration particulier.

3.7. L'objet des revendications 1-27 ne présente pas de caractère inventif.

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

4.1. La revendication 1 a trait à un nombre très important de compositions lipidiques et contenant une multitude de principes actifs possibles. Suffisamment de fondement et d'exposé ne peut cependant être trouvé dans la demande que pour un nombre très

restreint de ces compositions revendiquées, à savoir une unique composition contenant du DOTAP/cholestérol/DSPE-PEG-mannose et du cGAMP comme supporté par les exemples.

Par ailleurs, il ne semble pas plausible que toutes les compositions revendiquées puissent traiter l'ensemble des maladies des revendications 24-26. Ainsi, la portée de ces revendications semble plus vaste que justifiée par le contenu de la description et les revendications 1-27 manquent nécessairement d'exposé et de fondement suffisant.

4.2. L'objet des revendications 15-16 est défini en utilisant un paramètre, à savoir la taille moyenne des particules. Ce paramètre manque de clarté car il dépend du type de particule étudié et du type de diamètre considéré. Ce paramètre a donc été interprété de façon très large dans la présente opinion.

4.3. L'objet de la revendication 18 est défini en utilisant un paramètre, à savoir l'indice de polydispersité. Or, vu l'intitulé de la revendication 18, il semble que ce paramètre puisse avoir différentes interprétations possibles. Ceci induit donc un manque de clarté. La revendication 18 a ainsi été interprétée de façon très large dans la présente opinion.