

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①① N° de publication :

3 136 375

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

22 05492

⑤① Int Cl⁸ : A 61 K 9/10 (2022.01), A 61 K 47/44

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 08.06.22.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.12.23 Bulletin 23/50.

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

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) ETABLISSE-
MENT PUBLIC A CARACTERE SCIENTIFIQUE ET
TECHNOLOGIQUE — FR et UNIVERSITE
D'ORLEANS ETABLISSEMENT PUBLIC A CARAC-
TERE SCIENTIFIQUE, CULTUREL, PROFESSIONEL
— FR.

⑦② Inventeur(s) : DELALANDE Anthony et PICHON
Chantal.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) ETABLISSEMENT PUBLIC A
CARACTERE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE, UNI-
VERSITE D'ORLEANS ETABLISSEMENT PUBLIC A CARAC-
TERE SCIENTIFIQUE, CULTUREL, PROFESSIONEL.

⑦④ Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

⑤④ Microbulles lipidiques pour la délivrance ciblée d'actifs.

⑤⑦ La présente invention concerne des microbulles opti-
misées, en particulier des microbulles lipidiques, pouvant
être utilisés dans la prévention et le traitement de maladies
ou encore le marquage.

L'invention concerne en particulier une microbulle lipi-
dique, comprenant au moins un composé cationique choisi
parmi les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines his-
tidylées, et tout mélange de ceux-ci. La microbulle compren-
nant de préférence en outre au moins un agent choisi parmi
un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de
marquage, et toute combinaison de ceux-ci.

L'invention se rapporte en outre à une méthode de pro-
duction de cette microbulle.

La présente invention concerne également une compo-
sition, notamment une composition pharmaceutique, et un
kit, comprenant au moins une de ces microbulles. La pré-
sente invention porte en outre sur l'utilisation de ces micro-
bulles, composition, kit, comme médicament ou comme
agent de marquage.

FR 3 136 375 - A1



Description

Titre de l'invention : Microbulles lipidiques pour la délivrance ciblée d'actifs

Domaine de l'invention

- [0001] La présente invention s'inscrit dans le domaine de la délivrance ciblée d'actifs, pour de la thérapie et/ou du marquage, ainsi que dans le domaine des microbulles, notamment des microbulles fonctionnalisées.
- [0002] La présente invention concerne notamment des microbulles optimisées, en particulier des microbulles lipidiques, pouvant être utilisés dans la prévention et le traitement de maladies ou encore le marquage.
- [0003] L'invention concerne en particulier une microbulle lipidique, comprenant au moins un composé cationique choisi parmi les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci. La microbulle comprenant de préférence en outre au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci.
- [0004] L'invention se rapporte en outre à une méthode de production de cette microbulle.
- [0005] La présente invention concerne également une composition, notamment une composition pharmaceutique, et un kit, comprenant au moins une de ces microbulles. La présente invention porte en outre sur l'utilisation de ces microbulles, composition, kit, comme médicament ou comme agent de marquage.

Etat de la Technique

- [0006] Initialement développées à des fins de diagnostic, les microbulles (MB) peuvent également servir de vecteur à des fins thérapeutiques. En effet, grâce à la grande diversité de molécules pouvant composer l'enveloppe, il est ainsi possible d'encapsuler des drogues ou bien de complexer des acides nucléiques. Généralement, les MB servant de vecteurs possèdent une enveloppe lipidique fonctionnalisable, permettant soit d'enchâsser les molécules thérapeutiques entre les lipides, soit de les dissoudre dans une goutte d'huile à l'intérieur de l'enveloppe. De plus, en utilisant des lipides cationiques, il est possible de complexer des acides nucléiques par des interactions électrostatiques. D'autres lipides peuvent également être utilisés pour servir d'attaches à des nanoparticules ou des anticorps, à l'aide d'interactions streptavidine-biotine ou bien être fonctionnalisés afin de réaliser de la chimie-click.
- [0007] Quelques études ont permis la création de MB comme vecteurs de molécules d'intérêts. Ainsi Zhu et al., Scientific Reports, 2016, décrivent des MB chargées en agent chimio-thérapeutique (paclitaxel). Fan et al., Biomaterials, 2013, ont rapporté la mise au point de microbulles chargées avec un agent antinéoplasique

(1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée ou BCNU). Toutefois, les drogues complexées à ces MB sont limitées à des composés chimiques anticancers. En particulier, la possibilité de délivrer des acides nucléiques avec ces microbulles n'a pas été démontrée. Or, de plus en plus de thérapies émergentes, notamment des thérapies anticancers, utilisent des acides nucléiques. Ces molécules offrent une flexibilité inégalée par les composés chimiques, permettant par exemple des thérapies personnalisées.

- [0008] Delalande et al., Bioscience Reports, 2017, décrivent des MB cationiques complexées à des ADN plasmidiques. Toutefois, l'efficacité de délivrance des acides nucléique et la spécificité du ciblage par ces MB reste limitée. Ces aspects sont particulièrement critiques dans le cadre du traitement de pathologies cérébrales. En outre, un des obstacles majeurs aux traitements concerne le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Pour ces raisons, les molécules à délivrer dans le système nerveux central étaient jusqu'alors choisies pour leur capacité à traverser la BHE de façon passive. Cela implique une faible efficacité de délivrance des acides nucléique, ainsi qu'une quasi-absence de ciblage, pouvant être la cause de nombreux effets secondaires néfastes.
- [0009] Il est donc primordial de mettre au point de nouveaux moyens efficaces et spécifiques de délivrance au cerveau d'agents thérapeutiques, notamment d'acides nucléiques, capables de traverser la BHE sans être dégradés.
- [0010] Dans ce contexte, les microbulles représentent un système prometteur. Ainsi, Fan et al., 2016, ont produit des MB composées de folate et complexant des acides nucléiques dans le but d'une transfection ciblée au niveau cérébral.
- [0011] Ces microbulles cationiques sont basées sur l'utilisation de lipides DSTAP ou DPTAP, utilisant une fonction tri méthyl ammonium comme charge cationique pour la complexation. Le principal désavantage de ces formulations est qu'elles ne sont pas suffisamment efficaces pour être utilisable dans des protocoles de thérapie génique. De plus, il s'avère que ces formulations sont toxiques.
- [0012] Il existe donc toujours le besoin de mettre au point des microbulles capables de délivrer efficacement et de manière ciblée des agents thérapeutiques, tels que des acides nucléiques, à des organes voire à des cellules spécifiques.
- [0013] La présente invention permet de répondre à ce besoin, en décrivant des microbulles à base de nouvelles formulations cationiques dont les avantages sont les suivants :
- [0014] – Meilleure compaction des acides nucléiques,
 – Plus faible toxicité,
 – Utilisation du système d'échappement endosomal (« *proton sponge effect* ») pour augmenter la transfection et éviter la voie du lysosome,
 – Meilleure efficacité de transfection.
- [0015] Ainsi, les microbulles développées par les présents Inventeurs possèdent la capacité

de transporter des drogues, notamment des acides nucléiques, de façon stable dans la circulation sanguine ; de traverser la barrière hémato encéphalique de façon active ; de délivrer des drogues de manière ciblées, notamment envers des antigènes d'intérêt. La technologie ici mise au point permet en effet d'ouvrir transitoirement la BHE et de délivrer efficacement des actifs de type acides nucléiques à travers celle-ci. Elle permet également de perméabiliser les vaisseaux, afin de délivrer des molécules d'intérêts.

Exposé de l'invention

- [0016] Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis au point des microbulles innovantes, notamment des microbulles lipidiques innovantes, capables de transporter des drogues, notamment des acides nucléiques, de façon stable dans la circulation sanguine ; de traverser la barrière hémato encéphalique (BHE) de façon active ; et de délivrer des drogues de manière ciblées, notamment envers des antigènes d'intérêt.
- [0017] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les microbulles lipidiques ainsi mises au point possèdent une stabilité significativement améliorée, à la différence des microbulles décrites dans l'art antérieur. De façon remarquable, les données révèlent également que ces microbulles optimisées sont capables de délivrer des agents d'intérêt, notamment des acides nucléiques, de manière plus efficace que les microbulles décrites dans l'art antérieur. Ces microbulles sont notamment capables de traverser les vaisseaux, ainsi que la BHE, ou encore le microenvironnement tumoral, de façon active. Les Inventeurs ont également démontré que l'application localisée d'ultrasons permet de cibler ces microbulles optimisées de manière très précise vers la zone à traiter, y compris des zones très difficiles d'accès telles que le système nerveux central, les vaisseaux, et le microenvironnement tumoral. Ces données révèlent ainsi le potentiel thérapeutique de ces microbulles lipidiques pour traiter de nombreuses pathologies de manière ciblée, y compris des pathologies du système nerveux central.
- [0018] Les données montrent également que ces microbulles optimisées sont des outils de détection et d'imagerie.
- [0019] La présente invention fournit donc à la fois des méthodes de traitement puissant et à spectre large de pathologies, ainsi que des méthodes de diagnostic efficace et fiable.

Description détaillée de l'invention

Résumé de l'invention

- [0020] La présente invention concerne notamment des microbulles lipidiques, pouvant être utilisées à la fois dans la prévention et le traitement de pathologies, et dans la détection et l'imagerie, notamment médicales.
- [0021] La présente invention concerne en particulier une microbulle lipidique, comprenant au moins un composé cationique choisi parmi les lipophosphoramidates, les polyéthyl-

lénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci.

[0022] La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant au moins une microbulle telle que définie ci-dessus, et, optionnellement, un excipient pharmaceutiquement acceptable, la concentration en microbulles dans la composition allant de préférence de 10^6 à 10^{14} microbulles/ml, de préférence encore de 10^7 à 10^{13} microbulles/ml, de préférence encore de 10^8 à 10^{12} microbulles/ml, de préférence encore de 10^9 à 10^{11} microbulles/ml, de préférence encore la concentration en microbulles dans la composition étant d'environ 10^{10} microbulles/ml.

[0023] La présente invention concerne aussi un kit, comprenant :

[0024] a) au moins une microbulle telle que définie ci-dessus, dans un premier récipient ;

[0025] b) au moins un agent thérapeutique, dans un second récipient ;

[0026] c) optionnellement, au moins un agent de ciblage dans un troisième récipient ;

[0027] d) optionnellement, au moins un agent de marquage dans un quatrième récipient ;

[0028] e) optionnellement, des instructions de préparation et/ou d'utilisation ;

[0029] l'agent thérapeutique et/ou l'agent de ciblage et/ou l'agent de marquage étant de préférence choisi(s) parmi :

- [0030]
1. un acide nucléique ;
 2. un actif liposoluble ;
 3. un agent chimio-thérapeutique, tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique ;
 4. un anticorps ;
 5. une protéine ;
 6. un antigène ;
 7. une toxine ;
 8. un récepteur
 9. une enzyme ;
 10. une hormone ;
 11. un ligand ;
 12. un vecteur viral ;
 13. une nanoparticule, comprenant de préférence au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
 14. tout dérivé de 1) à 13), de préférence tout dérivé fonctionnel de ceux-ci ;
 15. tout fragment de 1) à 14), de préférence tout fragment fonctionnel de ceux-ci ;
et
 16. toute combinaison de 1) à 15) ;

[0031] de préférence encore parmi un acide nucléique, un actif liposoluble, un agent chimio-thérapeutique, un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps

ou de son dérivé, une protéine, un fragment de protéine, une nanoparticule, et toute combinaison de ceux-ci.

[0032] Selon un autre aspect, la présente invention est relative à une microbulle, une composition pharmaceutique, ou un kit, tels que définis ci-dessus, pour son utilisation comme médicament ou comme agent de marquage.

[0033] Selon un autre aspect, la présente invention concerne une méthode de production d'au moins une microbulle telle que définie ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

- [0034] a. Mélange, dans un récipient, de composés cationiques choisis parmi les lipophosphoramidates, les polyéthyléimines histidylées, et les mélanges quelconques de ceux-ci ; d'éthanol; et optionnellement d'au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
- b. Evaporation du mélange obtenu à l'étape a) pour obtenir un film lipidique et réhydratation du film lipidique pour former une suspension liposomale; l'intégralité de cette étape pouvant également être réalisée par micro-fluidique ;
- c. Lyophilisation de la suspension liposomale obtenue à l'étape b) ;
- d. Remplacement de l'air contenu dans le récipient contenant le lyophilisat obtenu à l'étape c), par un gaz biocompatible, le gaz étant de préférence choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), un oxyde d'azote (NO), l'hydrogène, le dioxygène, l'hélium, le xénon, l'argon, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci ;
- e. Réhydratation du lyophilisat de l'étape d) pour obtenir une solution;
- f. Agitation de la solution obtenue à l'étape d) pour former des microbulles ;
- g. Optionnellement, fonctionnalisation des microbulles par au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ; et/ou fonctionnalisation des microbulles par l'ajout au moins un groupement fonctionnel permettant la liaison à au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci.

Définitions

[0035] Les termes « **au moins un(e)** » sont ici considérés synonymes aux termes « un(e) ou plusieurs », ou encore aux termes « un(e) ou plus ».

[0036] Dans le présent document, le terme « **microbulle** » désigne une bulle dont le diamètre va d'environ un micromètre à plusieurs dizaines de micromètres (jusqu'à une centaine de micromètres environ), en général d'environ un micromètre à une dizaine

de micromètres. Une microbulle comprend une enveloppe entourant un matériau de remplissage. L'enveloppe peut être constituée de lipides, de protéines, de sucres, de composés ioniques, ou de mélanges de ceux-ci. Dans le cas d'une enveloppe constituée de lipides ou essentiellement constituée de lipides, on parle de microbulle lipidique.

[0037] Parmi les composés pouvant être utilisés pour former une enveloppe de microbulles selon la présente invention, on retrouve notamment :

- [0038] – Les composés cationiques, tels que les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci ; et/ou
- les lipides, notamment choisis dans le groupe constitué par une dimyristoyl-glycéro-phosphocholine, une distéaroyl-glycéro-phosphocholine, une dimyristoyl-glycéro-phosphoéthanolamine-polyéthylène glycol, une distéaroyl-glycéro-phosphoéthanolamine-polyéthylène glycol 2000, une distéaroyl-glycéro-phosphoéthanolamine-[biotinyl(polyéthylène glycol)], un cholestérol, un beta-sitostérol, un 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), un 1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-3-triméthylammonium propane (DOTAP), un 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (DMG-PEG2000), les lipides clickables DBCO, Tetrazine, Methyl tétrazine, NHS (DSPE-PEG2000-X), et toute combinaison de ceux-ci ;
- et toute combinaison de ceux-ci.

[0039] Le matériau de remplissage de la microbulle peut notamment être un gaz, de tout type. Le gaz de remplissage est avantageusement biocompatible (c'est-à-dire qu'il est bien toléré par un organisme vivant). Le gaz de remplissage peut notamment être choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), un oxyde d'azote (NO), l'hydrogène, le dioxygène, l'hélium, le xénon, l'argon, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci.

[0040] Par « **microbulle lipidique** » on entend une microbulle dont l'enveloppe est essentiellement constituée de lipides, ou est constituée de lipides. Les termes « enveloppe essentiellement constituée de lipides » signifient ici une enveloppe comprenant 55% de lipides ou plus, de préférence 60% de lipides ou plus, de préférence 70% de lipides ou plus, de préférence 80% de lipides ou plus, de préférence 90% de lipides ou plus, de préférence 91% de lipides ou plus, de préférence 92% de lipides ou plus, de préférence 93% de lipides ou plus, de préférence 94% de lipides ou plus, de préférence 95% de lipides ou plus, de préférence 96% de lipides ou plus, de préférence 97% de lipides ou plus, de préférence 98% de lipides ou plus, de préférence encore 99% de lipides ou plus, le pourcentage étant exprimé en masse de lipides par rapport à la masse totale de

l'enveloppe.

- [0041] Avantageusement, la microbulle lipidique comprend au moins un composé cationique, en particulier un lipide cationique ou un lipide couplé à au moins un polymère cationique.
- [0042] L'enveloppe de la microbulle lipidique peut comprendre un lipide cationique ou un lipide couplé à au moins un polymère cationique, ou être essentiellement constituée de lipides cationiques ou de lipides couplés à au moins un polymère cationique, ou consister en des lipides cationiques et/ou en des lipides couplés à au moins un polymère cationique.
- [0043] Avantageusement, l'enveloppe comprend des lipides cationiques et/ou des lipides couplés à au moins un polymère cationique, et des lipides fusogéniques.
- [0044] Selon une mise en œuvre, l'enveloppe lipidique de la microbulle comprend de 2 à 50% de lipides cationiques, de préférence au moins 2% de lipides cationiques, de préférence au moins 10% de lipides cationiques, de préférence au moins 20% de lipides cationiques, de préférence au moins 30% de lipides cationiques, de préférence au moins 40% de lipides cationiques, de préférence 50% de lipides cationiques, le pourcentage étant exprimé en moles de lipides cationiques par rapport au nombre de moles de lipides totaux constituant l'enveloppe.
- [0045] Par « **composé cationique** », on entend un composé comprenant au moins un cation et dont la charge globale en solution est positive. Des exemples de composés cationiques (lipides cationiques) utilisables pour former une enveloppe de microbulle comprennent notamment, sans limitation : les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci. Par « **lipide cationique** », on entend donc un lipide comprenant au moins un cation et dont la charge globale en solution est positive.
- [0046] Par « **lipophosphoramidate** » on entend un phospholipide amphiphile bioinspiré qui porte une charge cationique sur sa tête polaire.
- [0047] Les lipophosphoramidates comprennent notamment les dimyristoyl phosphoramidates (tels que les dimyristoyl bromure phosphoramidates, et les dimyristoyl histamine phosphoramidates), et les dioleoyl phosphoramidates (tels que les dioleoyl methylimidazolium phosphoramidates).
- [0048] Par « **polyéthylénimine** », ou « **PEI** », ou « **polyaziridine** », on entend est un polymère organique de formule chimique $H[CH_2-CH_2-NH-]_nH$. Par « **polyéthylénimine histidylée** » on entend un polyéthylénimine comprenant au moins un groupement histidyle. Avantageusement, la polyéthylénimine histidylée utilisée pour former la microbulle est couplée à un acide gras. Des exemples d'acides gras pouvant être couplés à une polyéthylénimine histidylée comprennent notamment l'acide stéarique, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide oléique, et toute combinaison de ceux-ci.

- [0049] Par « **composé/agent exposé à la surface de la microbulle** » on entend un composé ou un agent conjugué/couplé/lié à la surface externe de la microbulle (par exemple conjugué/couplé/lié à l'enveloppe de la microbulle) et en contact avec le milieu extérieur à la microbulle.
- [0050] Par « **composé/agent enchâssé dans l'enveloppe lipidique de la microbulle** », on entend un composé ou un agent partiellement ou totalement intégré/incorporé dans la couche de composés (notamment des lipides) formant l'enveloppe de la microbulle. Ainsi, un composé ou un agent totalement intégré/incorporé dans l'enveloppe n'est en contact qu'avec les composés (notamment des lipides) formant l'enveloppe de la microbulle : dans ce cas, le composé ou l'agent n'est donc en contact ni avec le milieu extérieur, ni avec le milieu intérieur, à la microbulle. Un composé ou un agent partiellement intégré/incorporé dans l'enveloppe peut en revanche être soit avec le milieu extérieur à la microbulle, soit avec le milieu intérieur de la microbulle, soit à la fois avec le milieu extérieur et avec le milieu intérieur de la microbulle (composé « traversant »).
- [0051] Par « **composé/agent incorporé à l'intérieur de la microbulle** », on entend un composé ou un agent situé dans le milieu intérieur de la microbulle (c'est-à-dire dans le milieu/la cavité formé(e) par l'enveloppe de la microbulle). Ce composé ou agent peut être en contact avec la surface interne de la microbulle (par exemple avec la surface interne de l'enveloppe de la microbulle). Il peut notamment être conjugué/couplé/lié à la surface interne de la microbulle (par exemple à la surface interne de l'enveloppe de la microbulle).
- [0052] Par « **agent thérapeutique** » ou « **composé thérapeutique** », on entend tout agent ou tout composé ou toute molécule présenté(e) comme ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard de pathologies ou maladies, humaines ou animales. Un agent thérapeutique ou un composé thérapeutique comprend donc tout agent ou composé pouvant être utilisé chez l'homme ou l'animal ou administré à ceux-ci dans le but d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique et/ou métabolique. L'agent thérapeutique peut donc être un agent pharmacologique.
- [0053] **L'agent** ou le **composé thérapeutique** peut être de toute nature ou de tout type et ne dépend pas de son origine. L'agent thérapeutique peut être synthétisé chimiquement, d'origine naturelle, produit par recombinaison (et optionnellement purifié), ou encore conçu et produit synthétiquement. Il peut notamment s'agir d'une petite molécule, d'un acide nucléique, d'un peptide (y compris un peptide modifié de manière post-traductionnelle), d'un polypeptide (y compris un polypeptide modifié de manière post-traductionnelle), d'une protéine (y compris une protéine modifiée de manière post-traductionnelle), d'un composé chimique, d'un agent de chimiothérapie anticancéreuse

(tel qu'un agent cytostatique ou cytologique), d'un anticorps, d'une toxine, d'un antigène, d'une hormone, d'une enzyme, d'un ligand, d'un récepteur, d'un composé antiviral, d'un composé antibiotique, d'un composé antifongique, d'un composé antibactérien, d'une nanoparticule, ou de tout fragment de ceux-ci (de préférence un fragment fonctionnellement actif), ou de tout dérivé de ceux-ci (de préférence un dérivé fonctionnellement actif), tel qu'un peptidomimétique, un anticorps mimétique, un dérivé chimique, entre autres, etc. **L'agent** ou le **composé thérapeutique** peut par exemple comprendre, ou consister essentiellement en, ou consister en, un acide nucléique, un actif liposoluble, un agent chimio-thérapeutique (tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique), un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une protéine (y compris une protéine modifiée de manière post-traductionnelle), un fragment de protéine (tel qu'un peptide, un antigène, un épitope, un domaine fonctionnel de protéine, et toute combinaison de ceux-ci; y compris un fragment de protéine modifié de manière post-traductionnelle), une nanoparticule, etc.

[0054] Par « **agent de ciblage** » ou « **composé de ciblage** », on entend tout agent ou tout composé ou toute molécule présenté(e) comme étant capable de reconnaître et/ou de se lier à une autre molécule (dite « molécule cible »), de préférence de manière spécifique. Ces termes incluent donc également les "agents de liaison" ou « composés de liaison ». Les termes "**agents de liaison**" ou « **composés de liaison** » désignent tout agent ou tout composé ou toute molécule capable de se lier à une autre molécule (dite « molécule cible »), ladite liaison étant de préférence une liaison spécifique.

[0055] L'**agent de ciblage/liaison** reconnaît un site, un domaine, une région, une poche, un épitope, une configuration spatiale, une conformation, un groupement chimique, ou toute combinaison de ceux-ci, défini(e) de la molécule cible. L'agent de ciblage/liaison peut être de toute nature ou de tout type et ne dépend pas de son origine. L'agent de ciblage/liaison peut être synthétisé chimiquement, d'origine naturelle, produit par recombinaison (et optionnellement purifié), ou encore conçu et produit synthétiquement. Il peut notamment s'agir d'une petite molécule, d'un acide nucléique, d'un peptide (y compris un peptide modifié de manière post-traductionnelle), d'un polypeptide (y compris un polypeptide modifié de manière post-traductionnelle), d'une protéine (y compris une protéine modifiée de manière post-traductionnelle), d'un composé chimique, d'un anticorps, d'une toxine, d'un antigène, d'un épitope, d'une hormone, d'une enzyme, d'un ligand, d'un récepteur, d'une nanoparticule, ou de tout fragment de ceux-ci (de préférence un fragment fonctionnellement actif), ou de tout dérivé de ceux-ci (de préférence un dérivé fonctionnellement actif), tel qu'un peptidomimétique, un anticorps mimétique, un dérivé chimique, entre autres, etc. L'**agent de ciblage/liaison** peut par exemple comprendre, ou consister essentiellement en, ou consister en,

un acide nucléique, un actif liposoluble, un agent chimio-thérapeutique (tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique), un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une protéine (y compris une protéine modifiée de manière post-traductionnelle), un fragment de protéine (tel qu'un peptide, un antigène, un épitope, un domaine fonctionnel de protéine, et toute combinaison de ceux-ci; y compris un fragment de protéine modifié de manière post-traductionnelle), une nanoparticule, etc.

[0056] La molécule cible peut être de toute nature ou de tout type et ne dépend pas de son origine. La molécule cible peut notamment être un agent pathogène (tel qu'un virus, une bactérie, un parasite, etc.) ou un fragment de celui-ci (par exemple un acide nucléique, une protéine, un polypeptide, un peptide, un épitope, un lipide, un sucre, etc.).

[0057] Par « **agent de marquage** » ou « **marqueur** » on entend tout agent ou tout composé ou toute molécule présenté(e) comme étant capable de marquer une autre molécule (de préférence de manière spécifique) et d'être détecté par tout moyen. Les moyens de détection de l'agent de marquage sont bien connues de la personne du métier, qui est tout à fait à même de sélectionner la technique appropriée en fonction de l'agent de marquage utilisé. Les moyens de détection de l'agent de marquage incluent notamment les techniques suivantes, sans y être limité : les techniques de détection optique (telles que les techniques utilisant la fluorescence, l'absorbance, la diffraction, la diffusion de la lumière, l'interférométrie, la réflectométrie, l'ellipsométrie, la résonance des plasmons de surface (SPR), la spectroscopie, des particules magnétiques, etc.), les techniques de détection mécanique (telles que les techniques utilisant des micro-balances, des micro poutres, etc.), les techniques de détection électrique (telles que les techniques utilisant des électrodes, des capteurs électriques, etc.). L'agent de marquage peut donc être un agent de contraste.

[0058] L'**agent de marquage** peut être de toute nature ou de tout type et ne dépend pas de son origine. L'agent de ciblage/liaison peut être synthétisé chimiquement, d'origine naturelle, produit par recombinaison (et optionnellement purifié), ou encore conçu et produit synthétiquement. Il peut notamment s'agir d'une petite molécule, d'un acide nucléique, d'un peptide (y compris un peptide modifié de manière post-traductionnelle), d'un polypeptide (y compris un polypeptide modifié de manière post-traductionnelle), d'une protéine (y compris une protéine modifiée de manière post-traductionnelle), d'un composé chimique, d'un anticorps, d'une toxine, d'un antigène, d'un épitope, d'une hormone, d'une enzyme, d'un ligand, d'un récepteur, d'une nanoparticule, ou de tout fragment de ceux-ci (de préférence un fragment fonctionnellement actif), ou de tout dérivé de ceux-ci (de préférence un dérivé fonctionnellement actif), tel qu'un peptidomimétique, un anticorps mimétique, un dérivé chimique, entre autres,

etc. L'**agent de marquage** peut par exemple comprendre, ou consister essentiellement en, ou consister en, un acide nucléique, un actif liposoluble, un agent chimiothérapeutique (tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique), un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une protéine (y compris une protéine modifiée de manière post-traductionnelle), un fragment de protéine (tel qu'un peptide, un antigène, un épitope, un domaine fonctionnel de protéine, et toute combinaison de ceux-ci; y compris un fragment de protéine modifié de manière post-traductionnelle), une nanoparticule, etc.

[0059] L'**agent de marquage** peut par exemple comprendre, ou consister essentiellement en, ou consister en, un fluorophore (par exemple la fluorescéine ou la luciférase), d'un€ protéine/polypeptide/peptide florescent(e) (par exemple la GFP et ses variants, tels que la RFP, la CFP, la YFP, etc.), d'un radioisotope (notamment adapté à la scintigraphie, par exemple ^{99m}Tc), d'une étiquette reconnaissable par un anticorps (par exemple la protéine c-Myc ou une étiquette poly-histidine), d'une étiquette d'affinité (par exemple la biotine, la streptavidine, etc.), d'une enzyme (par exemple la peroxydase de raifort), d'un agent de contraste, d'un peptide étiquette (« peptide tag » en anglais), etc.

[0060] Le terme "**dérivé**" désigne généralement un composant ou une espèce (protéine, anticorps, fragment de protéine, polypeptide, polynucléotide, oligonucléotide, nucléoside, nucléotide, vecteur, virus, etc.) présentant une ou plusieurs modifications par rapport à un composant de référence (par exemple, le composant de type sauvage tel qu'on le trouve dans la nature tel qu'il a été identifié à l'origine, c'est-à-dire le composant correspondant "original" appelé le composant d'origine). Un dérivé peut notamment être un fragment, une partie, un variant, un mutant, une version synthétique (par exemple fabriqué, notamment in vitro), un mimétique, ou une combinaison de ceux-ci, du composant ou de l'espèce d'origine. Les termes "**variant**", ou "**mutant**", peuvent être utilisés de manière interchangeable pour désigner généralement un composant ou une espèce (protéine, anticorps, fragment de protéine, polypeptide, polynucléotide, oligonucléotide, nucléoside, nucléotide, vecteur, virus, etc.) présentant une ou plusieurs modifications par rapport à un composant de référence (par exemple, le composant de type sauvage tel qu'on le trouve dans la nature tel qu'il a été identifié à l'origine, c'est-à-dire le composant correspondant "original" appelé le composant d'origine). Un variant de nucléotide ou de nucléoside peut avoir une base modifiée et/ou un sucre modifié et/ou une liaison modifiée. En ce qui concerne les variants de polypeptides, de polynucléotides et d'anticorps, toute modification peut être envisagée, y compris la substitution, l'insertion, la suppression, et toute combinaison de celles-ci, d'un ou plusieurs résidus de nucléotides/acides aminés. Le variant peut être d'origine naturelle ou artificielle (par exemple, muté et/ou fabriqué).

- [0061] Lorsque plusieurs mutations sont envisagées, elles peuvent concerner des résidus consécutifs et/ou des résidus non consécutifs. Sont préférés les variants (par exemple, respectivement, les variants de protéine, les variants de peptides, les variants d'anticorps, les variants de virus, etc.) qui conservent un degré d'identité de séquence d'au moins 80 % avec le composant de référence (par exemple, respectivement, la protéine "originale" correspondante, le fragment de protéine "original" correspondant, le polynucléotide "original" correspondant). A titre d'exemple, "au moins 80% d'identité" signifie 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Dans certains modes de réalisation, une identité d'au moins 80 % englobe également une identité de 100 %.
- [0062] Par « **fragment fonctionnel** », ou « **fragment fonctionnellement actif** », on entend tout fragment d'une molécule, d'un agent, d'une espèce, d'un composé, présentant au moins une des fonctions originales de la molécule, de l'agent, de l'espèce, du composé, dont ledit fragment est issu. De préférence, le fragment fonctionnel réalise ladite fonction avec une efficacité égale à au moins 30% de celle dudit peptide ou de ladite protéine, de préférence au moins 40%, de préférence au moins 45%, de préférence au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence au moins 60%, de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70%, de préférence au moins 75%, de préférence au moins 80%, de préférence au moins 85%, de préférence au moins 90%, de préférence au moins 91%, de préférence au moins 92%, de préférence au moins 93%, de préférence au moins 94%, de préférence au moins 95%, de préférence au moins 96%, de préférence au moins 97%, de préférence au moins 98%, de préférence au moins 99%, de préférence au moins 100% de l'efficacité de ladite molécule, dudit agent, de ladite espèce, dudit composé, dont ledit fragment est issu.
- [0063] Par « **identité** » ou « **identité de séquence** », on entend une correspondance exacte de séquence entre deux polypeptides ou acides aminés, ou entre deux molécules d'acides nucléiques ou oligonucléotides. Les pourcentages d'identité auxquels il est fait référence dans le cadre de l'exposé de la présente invention sont déterminés après alignement global optimal des séquences à comparer, qui peuvent donc comprendre une ou plusieurs additions, délétions, troncatures et/ou substitutions. Ce pourcentage d'identité peut être calculé par toute méthode d'analyse de séquences bien connue de l'homme du métier. Le pourcentage d'identité est déterminé après alignement global des séquences à comparer prises dans leur intégralité, sur toute leur longueur. Outre manuellement, il est possible de déterminer l'alignement global de séquences au moyen de l'algorithme de Needleman et Wunsch (1970).
- [0064] Notamment, pour les séquences nucléotidiques, la comparaison des séquences peut être effectuée à l'aide de tout logiciel bien connu de l'homme du métier, comme par exemple le logiciel Needle. Les paramètres utilisés peuvent notamment être les

suivants : « *Gap Open* » égal à 10,0, « *Gap Extend* » égal à 0,5 et la matrice EDNAFULL (Version EMBOSS du NCBI NUC4.4).

- [0065] Pour les séquences d'acides aminés, la comparaison des séquences peut être effectuée à l'aide de tout logiciel bien connu de l'homme du métier, comme par exemple le logiciel Needle. Les paramètres utilisés peuvent notamment être les suivants : « *Gap Open* » égal à 10,0, « *Gap Extend* » égal à 0,5 et la matrice BLOSUM62.
- [0066] À titre illustratif, "au moins 80% d'identité de séquence", tel qu'utilisé ici, représente notamment 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% d'identité de séquence.
- [0067] Les termes "**polynucléotide**", "**molécule d'acide nucléique**" et "**acide nucléique**" sont utilisés de manière interchangeable dans le présent document et désignent une macromolécule polymère ou oligomère constituée de monomères nucléotidiques (de préférence d'au moins 5 monomères nucléotidiques, également appelés résidus nucléotidiques). Les monomères nucléotidiques sont composés d'une nucléobase, d'un sucre à cinq carbones (tel que, mais sans s'y limiter, le ribose ou le 2'-désoxyribose), et d'un à trois groupes phosphates. Typiquement, un polynucléotide est formé par des liaisons phosphodiester entre les monomères nucléotidiques individuels. Les molécules d'acide nucléique comprennent, sans s'y limiter, l'acide ribonucléique (ARN), l'acide désoxyribonucléique (ADN) et leurs mélanges, comme par exemple les hybrides ARN-ADN (polyribo-polydésoxyribonucléotides mixtes). Ces termes englobent les versions simples ou double brin, linéaires ou circulaires, naturelles ou synthétiques, non modifiées ou modifiées de celles-ci (par exemple, polynucléotides génétiquement modifiés ; polynucléotides optimisés), polynucléotides sens ou antisens, mélange chimérique (par exemple, hybrides ARN-ADN). En outre, un polynucléotide peut comprendre des nucléotides d'origine non naturelle et peut être interrompu par des composants non nucléotidiques. Les exemples d'acides nucléiques d'ADN comprennent, sans limitation, l'ADN complémentaire (ADNc), l'ADN génomique, l'ADN plasmidique, le vecteur d'ADN, l'ADN viral (par exemple, les génomes viraux, les vecteurs viraux), les oligonucléotides, les sondes, les amorces, l'ADN satellite, l'ADN microsatellite, l'ADN codant, l'ADN non codant, l'ADN antisens, et tout mélange de ceux-ci. Les acides nucléiques ARN exemplaires comprennent, sans limitation, l'ARN messager (ARNm), l'ARN messager précurseur (pré-ARNm), le petit ARN interférent (ARNsi), l'ARN en épingle à cheveux courte (ARNc), microARN (miARN), vecteur ARN, ARN viral, ARN guide (gRNA), ARN antisens, ARN codant, ARN non codant, ARN antisens, ARN satellite, petit ARN cytoplasmique, petit ARN nucléaire, etc. Les polynucléotides décrits ici peuvent être synthétisés par des méthodes standard connues dans l'art, par exemple en utilisant un synthétiseur d'ADN automatisé (tel que ceux qui

sont disponibles commercialement auprès de Biosearch, Applied Biosystems, etc.) ou obtenus à partir d'une source naturelle (par exemple un génome, un ADNc, etc.) ou d'une source artificielle (telle qu'une bibliothèque disponible commercialement, un plasmide, etc.) en utilisant des techniques de biologie moléculaire bien connues dans l'art (par exemple le clonage, la PCR, etc.). Les acides nucléiques peuvent par exemple être synthétisés chimiquement, par exemple selon la méthode du phosphotriester (voir, par exemple, Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584).

- [0068] L'acide nucléique peut comprendre au moins un nucléotide modifié (c'est-à-dire un nucléotide qui n'est pas un nucléotide d'un ADN ou un ARN naturel). Ces nucléotides modifiés peuvent notamment être utilisés afin d'augmenter la résistance de l'acide nucléique à la dégradation par les nucléases. Ceci est particulièrement avantageux pour les ARN, généralement plus sensibles aux nucléases que les aptamères ADN. Un ARN comprenant au moins un nucléotide modifié est appelé ARN modifié. Un ADN comprenant au moins un nucléotide modifié est appelé ADN modifié.
- [0069] L'acide nucléique peut également comprendre au moins un groupement additionnel, en plus des nucléotides constitutifs de sa séquence d'acide nucléique. Ainsi, l'acide nucléique peut être lié à au moins un groupement additionnel.
- [0070] Par « **ADN modifié** » on entend un ADN comportant au moins un nucléotide modifié. Un ADN modifié peut notamment être un ADN dans lequel le squelette de l'acide nucléique est modifié, en totalité ou en partie, en particulier pour le rendre résistant à une dégradation hydrolytique, en particulier du fait de l'action de nucléases. L'ADN peut être modifié en totalité (c'est à dire que chaque nucléotide qui le constitue est modifié) ou en partie (c'est à dire que seule une partie des nucléotides qui le constitue est modifié). Lorsque l'ADN est modifié en partie, on peut choisir de modifier tout ou partie des purines et/ou tout ou partie des pyrimidines.
- [0071] Par « **ARN modifié** » on entend un ARN comportant au moins un nucléotide modifié. Un ARN modifié peut notamment être un ARN dans lequel le squelette de l'acide nucléique est modifié, en totalité ou en partie, en particulier pour le rendre résistant à une dégradation hydrolytique, en particulier du fait de l'action de nucléases. L'ARN peut être modifié en totalité (c'est à dire que chaque nucléotide qui le constitue est modifié) ou en partie (c'est à dire que seule une partie des nucléotides qui le constitue est modifié). Lorsque l'ARN est modifié en partie, on peut choisir de modifier tout ou partie des purines et/ou tout ou partie des pyrimidines.
- [0072] Les modifications d'un ADN ou d'un ARN (et/ou d'un nucléotide) sont bien connues de l'homme du métier et peuvent notamment être choisies parmi : la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose

par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor) ; le remplacement du phosphodiester (PO) par un groupement phosphorothioate (PS) (on parle alors de squelette phosphorothioate) ; le recours à une structure de type acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acid, LNA), c'est-à-dire la formation d'un pont méthylène afin de verrouiller le ribose en conformation C3'-endo (N-type); le recours à une structure de type acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acid, PNA), c'est-à-dire le remplacement du squelette sucre-phosphate par un squelette de type peptide ; et une combinaison quelconque de ceux-ci.

- [0073] Par « **vecteur** », on entend un véhicule, de préférence une molécule d'acide nucléique ou une particule virale, qui contient les éléments nécessaires pour permettre l'administration, la propagation et/ou l'expression d'une ou plusieurs molécule(s) d'acides nucléiques dans une cellule hôte ou un organisme.
- [0074] D'un point de vue fonctionnel, ce terme englobe des vecteurs pour la maintenance (vecteurs de clonage), des vecteurs pour l'expression dans diverses cellules ou organismes hôtes (vecteurs d'expression), des vecteurs extrachromosomiques (par exemple des plasmides multicopie) ou des vecteurs d'intégration (par exemple conçus pour s'intégrer dans le génome d'une cellule hôte et produire des copies supplémentaires de la molécule d'acides nucléiques qu'il contient lorsque la cellule hôte se réplique). Ce terme englobe également des vecteurs navettes (par exemple, fonctionnant à la fois dans des hôtes procaryotes et/ou eucaryotes) et des vecteurs de transfert (par exemple pour le transfert de molécule(s) d'acides nucléiques dans le génome d'une cellule hôte).
- [0075] D'un point de vue structurel, les vecteurs peuvent être des sources génétiques naturelles, synthétiques ou artificielles, ou une combinaison d'éléments génétiques naturels et artificiels.
- [0076] Ainsi, dans le contexte de l'invention, le terme "vecteur" doit être compris de manière large en incluant des vecteurs plasmidiques (ou plasmides) et viraux.
- [0077] Un "**plasmide**" tel qu'utilisé ici désigne une construction d'ADN répliquable. Habituellement, les vecteurs plasmidiques contiennent des gènes marqueurs de sélection qui permettent aux cellules hôtes portant le plasmide d'être identifiées et/ou sélectionnées de manière positive ou négative en présence du composé correspondant au marqueur de sélection. Une variété de gènes marqueurs de sélection positives ou négatives sont connus dans la technique. À titre d'illustration, un gène de résistance aux antibiotiques peut être utilisé comme un gène marqueur de sélection positive permettant de sélectionner une cellule hôte en présence de l'antibiotique correspondant.
- [0078] Le terme "**vecteur viral**" tel qu'utilisé ici se réfère à un vecteur d'acide nucléique qui comprend au moins un élément d'un génome du virus et peut être conditionné dans une

particule virale ou une particule virale. Les vecteurs viraux peuvent être compétents pour la réplication ou sélectifs (par exemple, conçus pour se répliquer mieux ou sélectivement dans des cellules hôtes spécifiques), ou peuvent être génétiquement désactivés de manière à être défectueux ou déficients en réplication.

[0079] Par « **polypeptide** », « **protéine** », « **fragment de protéine** » et « **peptide** », on entend des polymères de résidus d'acides aminés qui comprennent au moins neuf acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Le polymère peut être linéaire, ramifié ou cyclique. Le polymère peut comprendre des acides aminés naturels et/ou analogues d'acides aminés et il peut être interrompu par des résidus non-acides aminés. Comme indication générale et sans y être cependant lié dans le présent document, si le polymère d'acides aminés contient plus de 50 résidus d'acides aminés, il est de préférence appelé un polypeptide ou une protéine, alors que si le polymère est constitué de 50 acides aminés ou moins, il est de préférence appelé "peptide". Les sens de lecture et d'écriture d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide, d'une protéine et d'un peptide tel qu'utilisés ici sont les sens de lecture et d'écriture conventionnels. La convention de lecture et d'écriture pour des séquences d'acides aminés d'un polypeptide, d'une protéine et d'un peptide place la terminaison amine à gauche, la séquence étant alors écrite et lue de la terminaison amine (N-terminus) à la terminaison carboxyle (C-terminus), de gauche à droite.

[0080] Les acides aminés constituant les polypeptides, protéines et peptides, comprennent notamment les acides aminés dits « standards » (également appelés « acides aminés naturels », dont le tableau 1 ci-dessous fournit une liste non exhaustive), ainsi que les acides aminés non standards (également appelés « acides aminés rares », comprenant par exemple la pyrrolysine (symbolisée par la lettre O), la sélénocystéine (symbolisée par la lettre U), l'alloisoleucine, l'allothréonine, l'ornithine, etc.)

[0081] **Tableau 1** : Acides aminés standards

[0082] [Tableaux1]

Nom	3 lettres	1 lettre
alanine	Ala	A
arginine	Arg	R
asparagine	Asn	N
Aspartate ou acide aspartique	Asp	D
cystéine	Cys	C
Glutamate ou acide glutamique	Glu	E
glutamine	Gln	Q
glycine	Gly	G
histidine	His	H
isoleucine	Ile	I
leucine	Leu	L
lysine	Lys	K
méthionine	Met	M
phénylalanine	Phe	F
proline	Pro	P
sérine	Ser	S
thréonine	Thr	T
tryptophane	Trp	W
tyrosine	Tyr	Y
valine	Val	V

[0083] Par « **fragment de peptide ou de protéine** » ou « **partie de peptide ou de protéine** » ou entend une portion d'un peptide ou d'une protéine, c'est-à-dire une portion de la séquence d'acides aminés consécutifs composant ledit peptide ou ladite protéine (appelés peptide ou protéine dont le fragment est issu). Le fragment de peptide ou de protéine comprend de préférence au moins 10 acides aminés consécutifs du peptide ou de la protéine, dont il est issu ; de préférence encore au moins 12 acides aminés consécutifs, de préférence encore au moins 15 acides aminés consécutifs, de préférence encore au moins 20 acides aminés consécutifs, de préférence encore au moins 30

acides aminés consécutifs du peptide ou de la protéine dont il est issu. Le fragment de peptide ou de protéine présente de préférence une structure tridimensionnelle, dans des conditions non dénaturantes (par exemple des conditions habituellement non dénaturantes pour les protéines, notamment en absence d'agents dénaturants et/ou chaotropiques).

[0084] Telle qu'utilisés ici, les termes "**modification post-traductionnelle**" se réfèrent à une modification chimique ou enzymatique se produisant naturellement ou non sur une protéine ou un fragment de protéine, après ou concomitamment à la traduction de la protéine (par exemple, la synthèse biologique ou biochimique, utilisant par exemple la machinerie cellulaire), ou après ou concomitamment à la synthèse de la protéine (par exemple, la synthèse artificielle et/ou chimique). Cela signifie qu'au moins un des acides aminés naturels de la protéine ou du fragment de protéine est modifié par l'ajout d'au moins un groupe chimique et/ou la modification (y compris, mais sans s'y limiter, l'élimination) d'au moins un groupe chimique de l'acide aminé naturel. Des exemples de telles modifications chimiques ou enzymatiques incluent, sans limitation, la glycosylation, la phosphorylation, l'acylation, la carboxylation, l'acétylation, la biotinylation, l'hydroxylation, la lipoylation, l'amidation, l'ubiquitination, la sumoylation, la désamination, etc. Par "protéine modifiée de façon post-traductionnelle", on entend ici une protéine ayant au moins une modification post-traductionnelle. Par "fragment de protéine modifié de manière post-traductionnelle", on entend un fragment de protéine ayant au moins une modification post-traductionnelle.

[0085] Par « **actif liposoluble** » on entend tout agent ou tout composé ou toute molécule qui se solubilise dans un corps gras, et ayant une activité biologique, notamment une activité thérapeutique, pharmacologique, de ciblage, ou de marquage, telles que définies ci-dessus en regard avec les agents thérapeutiques, de ciblage, ou de marquage. Les **actifs liposolubles** comprennent notamment les actifs qui se solubilisent dans les lipides ou leurs dérivés, par exemple dans les huiles, beurres, esters huileux, et autres ingrédients comprenant des lipides ou leurs dérivés.

[0086] Par « **agent chimio-thérapeutique** » on entend tout agent ou tout composé ou toute molécule ayant une activité chimio-thérapeutique. L'agent chimio-thérapeutique comprend notamment les agents ayant une activité anticancer (notamment les agents capables d'éliminer des cellules cancéreuses et/ou tumeurs, et/ou d'induire/stimuler l'élimination de cellules cancéreuses et/ou tumeurs) ainsi que les agents ayant une activité anti-maladie auto-immune. L'agent chimio-thérapeutique peut donc être un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique. Des exemples d'agents chimio-thérapeutiques comprennent notamment, sans y être limité, le paclitaxel, la doxorubicine, la gencitabin (e.g. Gemzar), le témozolomide, etc.

[0087] Par "**anticorps**" on entend une protéine ou une glycoprotéine appartenant à la su-

perfamille des immunoglobulines ; les termes anticorps et immunoglobuline sont utilisés indifféremment. Chez les mammifères, les anticorps sont pour la plupart sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B : les plasmocytes. Ils sont notamment utilisés par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les corps étrangers (notamment les agents pathogènes, tels que les bactéries, les virus, les parasites, etc.), de manière spécifique. Les anticorps comprennent également les auto-anticorps (produits par exemple dans le cas d'une maladie auto-immune). L'anticorps reconnaît une partie unique de la cible étrangère, son antigène.

- [0088] Les anticorps présentent une structure formée de 4 chaînes polypeptidiques (150 000 uma ou dalton) : deux chaînes lourdes identiques (H pour « heavy », de 50 000 uma chacune) et deux chaînes légères identiques (L pour « light », de 25 000 uma chacune) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant la cohésion de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y (chaque chaîne légère constitue pour moitié un bras du Y) et sont constituées de domaines immunoglobulines pouvant comprendre 110 acides aminés environ. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant (nommé CL) et d'un domaine variable (appelé VL); les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable (appelé VH) et, selon l'isotype, de trois ou quatre domaines constants respectivement appelés CH1, CH2, CH3, (CH4). Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. Les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre, caractéristiques de l'espèce et de l'isotype. Les domaines constants ne sont généralement pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans l'activation du système du complément, ainsi que dans l'élimination des complexes immuns (anticorps lié à son antigène) par les cellules immunitaires possédant les récepteurs aux fragments constants (R_{FC}). Un anticorps possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras ».
- L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (VH) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (VL) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène. Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras. Ces deux sites sont identiques (mais destiné à différents épitopes), d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps. Le site de reconnaissance de l'antigène (ou paratope) comprend 6 régions appelées régions déterminant la complémentarité (ou CDR, pour « Complementarity-determining regions » en anglais). Chaque VH comporte 3 CDR et chaque VL en comporte également 3.

- [0089] Le clivage enzymatique spécifique permet d'isoler différents fragments :

- [0090] – le fragment Fc (Fragment cristallisable). Il est le support des propriétés biologiques de l'immunoglobuline, en particulier sa capacité à être reconnu par

des effecteurs de l'immunité ou à activer le complément. Il est constitué des fragments constants des chaînes lourdes (CH2) au-delà de la région charnière (« hinge », en anglais). Il ne reconnaît en général pas l'antigène ;

- le fragment Fv (Fragment variable). C'est le plus petit fragment gardant les propriétés de l'anticorps que possède l'immunoglobuline. Il est constitué uniquement des régions variables VL et VH, il fixe donc l'antigène avec la même affinité que l'anticorps complet et est monovalent ;
- le fragment Fab (Fragment antigen-binding). Ce fragment a la même affinité pour l'antigène que l'anticorps complet. Le fragment Fab est formé de la chaîne légère en entier (VL+CL) et d'une partie de la chaîne lourde (VH+CH1). Il est monovalent ;
- le fragment F(ab')₂. Il correspond à l'association de deux fragments Fab reliés par une petite partie des parties constantes des chaînes lourdes, la région charnière (en anglais : hinge). Il a la même affinité que l'anticorps pour l'antigène et est divalent.

[0091] Tel qu'il est utilisé ici, le terme anticorps englobe les anticorps natifs et leurs dérivés fonctionnels, (par exemple, les anticorps mutés et/ou modifiés ainsi que les anticorps mimétiques), à condition qu'un tel dérivé soit capable de se lier spécifiquement à un antigène (on parle de « **dérivés fonctionnels d'anticorps** »). Tel qu'il est utilisé ici, le terme « **dérivés d'anticorps** » englobe également les fragments d'anticorps. De préférence, un « **fragment d'anticorps** » est capable de se lier spécifiquement à un antigène (on parle de « **fragment fonctionnel d'anticorps** »).

[0092] Les anticorps peuvent être produits par différents systèmes connus de l'homme du métier. Les systèmes de production d'anticorps comprennent par exemple les systèmes animaux (tels que des rongeurs, des camélidés, etc.), les systèmes d'hybridomes, les systèmes cellulaires mammifères (incluant notamment les lignées cellulaires CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois ; par exemple CHO-K1, CHO-DG44, etc.), les lignées cellulaires de myélome de souris (par exemple NS0), les lignées cellulaires de rein de bébé hamster (par exemple BHK), les lignées cellulaires de rein embryonnaire humain (par exemple HEK293), etc.), les systèmes levures (incluant notamment les levures améliorées pour la glycolisation), les systèmes cellulaires d'insectes (incluant notamment les lignées cellulaires d'insecte améliorées pour la glycolisation), les systèmes cellulaires de plantes (incluant notamment les lignées cellulaires de plantes améliorées pour la glycolisation), etc.

[0093] De préférence, l'anticorps est un anticorps d'un animal, de préférence un anticorps de mammifère, plus préférablement un anticorps humain ou humanisé. Avantageusement, l'anticorps est humanisé.

[0094] Le terme « anticorps » englobe les anticorps natifs et leurs dérivés (par exemple, les

anticorps mutés et/ou modifiés ainsi que les anticorps mimétiques), de préférence à condition que ce dérivé soit capable de se lier spécifiquement à un antigène.

[0095] Les différentes catégories d'anticorps et leurs méthodes de production sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le domaine (tels que Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz, Graham Johnson Cell Biology E-Book, Elsevier Health Sciences, 1 Nov. 2016 ; Mohammed Zourob, Recognition Receptors in Biosensors, DOI 10.1007/978-1-4419-0919-0, Springer-Verlag New York 2010 ; Abbas, Lichtman, Pillai, Cellular and Molecular Immunology E-Book, Elsevier Health Sciences, 22 août 2014 ; Bayer V., Un aperçu des anticorps monoclonaux. Semin Oncol Nurs. 2019 Sep 2:150927 ; Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Pharmacocinétique et pharmacodynamique des anticorps monoclonaux. Clin Pharmacol Ther. 2008 Nov;84(5):548-58).

[0096] Le terme "**fragment fonctionnel d'anticorps**", tel qu'il est utilisé ici, désigne une ou plusieurs partie(s) ou fragment(s) d'un anticorps, conservant la capacité de se lier spécifiquement à un antigène. Des exemples de fragments de liaison englobés dans le terme "fragment fonctionnels d'anticorps" comprennent, sans s'y limiter, un fragment de liaison à l'antigène (Fab), un fragment Fab', un fragment F(ab')₂, un fragment variable (Fv), un fragment variable à chaîne unique (scFv pour « single chain variable fragment »), correspondant aux régions VH et VL fusionnées à l'aide d'un peptide de liaison), un fragment dsFv (« disulfide-bond stabilised Fv »), un fragment ds-scFv (« disulfide-bond stabilised scFv »), un domaine VH, un domaine VL, un di-scFv (scFv divalent, constitué de l'association de deux scFv), un « diabody » (constitué de l'association covalente ou non de deux scFv), un « diabody » à chaîne unique, un triple corps, un minicorps (« minibody », constitué des fragments VL-VH-CH₃), un nanocorps (« nanobody »), un anticorps à domaine unique (sdAb), un fragment d'anticorps à chaîne unique (scAb), un anticorps à chaîne lourde (HcAb), un VHH, un VNAR (variable new antigen receptor), un récepteur de nouvel antigène d'immunoglobuline (IgNAR), un engageur de cellules T bispécifique (BITes), une molécule de reciblage à double affinité (DART), et toute combinaison de ceux-ci (par ex. une protéine de fusion de ceux-ci).

[0097] Le terme "**anticorps à domaine unique**", ou « sdAb », tel qu'il est utilisé ici, désigne les fragments d'anticorps constitués d'un seul domaine variable monomère d'un anticorps. Ces anticorps ne comprennent que les régions variables monomériques de la chaîne lourde des anticorps à chaîne lourde produits notamment par les camélidés ou les poissons cartilagineux. En raison de leurs origines différentes, ils sont également appelés fragments VHH (camélidés) ou VNAR (variable new antigen receptor ; poissons cartilagineux). Les anticorps à domaine unique sont également appelés

nanocorps (nanobody en anglais). Les anticorps à domaine unique peuvent également être obtenus par monomérisation des domaines variables d'anticorps conventionnels de souris ou d'humains par le biais du génie génétique. Ils présentent une masse moléculaire d'environ 12-15 kDa et sont donc les plus petits fragments d'anticorps capables de reconnaître un antigène.

[0098] Le terme "**diabody**" tel qu'il est utilisé ici désigne une protéine de fusion ou un anticorps bivalent qui peut se lier à différents antigènes. Un diabody est composé de deux chaînes protéiques uniques qui comprennent des fragments d'un anticorps, à savoir des fragments variables. Les diabodies comprennent un domaine variable de chaîne lourde (VH) relié à un domaine variable de chaîne légère (VL) sur la même chaîne polypeptidique (VH-VL, ou VL-VH). En utilisant un court peptide reliant les deux domaines variables, les domaines sont forcés de s'apparier avec le domaine complémentaire d'une autre chaîne et créent ainsi deux sites de liaison à l'antigène. Les diabodies peuvent cibler le même antigène (monospécifique) ou des antigènes différents (bispécifique).

[0099] Les termes "**anticorps mimétique**" ou "**mimétique d'anticorps**" tel qu'utilisés ici, font référence à des composés qui peuvent se lier spécifiquement à des antigènes, de manière similaire à un anticorps, mais qui ne sont pas structurellement liés aux anticorps. Habituellement, les mimétiques d'anticorps sont des peptides ou des protéines artificielles ayant une masse molaire d'environ 3 à 20 kDa qui comprennent un, deux ou plusieurs domaines exposés se liant spécifiquement à un antigène. Des exemples d'anticorps mimétiques comprennent, entre autres, le LACI-D1 (inhibiteur de la coagulation associé aux lipoprotéines) ; les affilines, par exemple l'ubiquitine humaine ou l' γ B cristalline humaine ; la cystatine ; Sac7D de *Sulfolobus acidocaldarius* ; les lipocalines et les anticalines dérivées des lipocalines ; les DARPin (domaines répétés d'ankyrine conçus ou « Designed Ankyrin Repeat Proteins » en anglais) ; le domaine SH3 de Fyn ; les domaines Kunits des inhibiteurs de protéase ; les monobodies, par exemple le 10^{ème} domaine de type III de la fibronectine ; les adnectines ; les knottines (miniprotéines à nœud de cystéine) ; les atrimères ; les evibodies ; les affibodies, par exemple le faisceau de trois hélices du domaine Z de la protéine A de *Staphylococcus aureus* ; les Trans-bodies, par exemple la transferrine humaine ; les tétranectines, par exemple le domaine monomérique ou trimérique de la lectine de type C humaine ; les microbodies (micro-corps), par exemple l'inhibiteur de trypsine-II ; les protéines répétées de type armadillo ; etc. Les acides nucléiques et les petites molécules peuvent également être considérés comme des mimétiques d'anticorps (par exemple les aptamères), mais pas les anticorps artificiels, les fragments d'anticorps et les protéines de fusion composées à partir de ceux-ci. Les avantages communs par rapport aux anticorps sont une meilleure solubilité, une meilleure pé-

nétration dans les tissus, une stabilité vis-à-vis de la chaleur et des enzymes, et des coûts de production comparativement faibles.

- [0100] Les termes "**DARPin**" ou "**Designed Ankyrin Repeat Protein**" désignent ici des protéines mimétiques d'anticorps obtenues par génie génétique qui présentent généralement une liaison hautement spécifique et de haute affinité avec la protéine cible. Elles sont dérivées de protéines naturelles à répétition ankyrine, l'une des classes de protéines de liaison les plus courantes dans la nature, qui sont responsables de diverses fonctions telles que la signalisation cellulaire, la régulation et l'intégrité structurale de la cellule. Les DARPins comprennent, ou consistent essentiellement en, ou consistent en, au moins trois motifs ou modules répétés, dont les modules les plus N- et les plus C-terminaux sont appelés "caps", car ils protègent le noyau hydrophobe de la protéine. Le nombre de modules internes est indiqué par un nombre (par exemple N1C, N2C, N3C, ...) tandis que les capuchons sont indiqués par "N" ou "C", respectivement.
- [0101] Par « **antigène** » on entend une molécule naturelle ou synthétique qui, reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire d'un organisme, est capable de déclencher chez celui-ci une réponse immunitaire. Ainsi toute substance étrangère, tout microbe, introduit dans le corps, peut se comporter en antigène, c'est-à-dire y provoquer la fabrication de protéines spéciales, les anticorps qui ont la propriété de neutraliser les effets nocifs de la substance étrangère. Les antigènes sont généralement des peptides, des protéines, des sucres (tels que polysaccharides ou polyosides) et leurs dérivés lipidiques (lipides). Les antigènes peuvent également être des acides nucléiques, ou des haptènes (soit des fragments d'antigènes). Les antigènes, en tant que marqueurs des agents étrangers à l'organisme, sont à la base de la réponse immunitaire adaptative. C'est la reconnaissance de l'antigène par les cellules immunocompétentes, directement ou via les cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui active l'immunité spécifique. Dans le cas d'antigènes protéiques, on nomme « **épitope** » ou « déterminant antigénique » la partie de l'antigène reconnue par un anticorps ou un récepteur lymphocytaire. Un même antigène peut comporter plusieurs épitopes (identiques ou différents) et ainsi induire une réponse immunitaire variée. Il existe des épitopes séquentiels, correspondant à une séquence d'acides aminés, et des épitopes conformationnels, liés à la structure de la protéine et donc sensibles à la dénaturation. La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes dépend de la nature de l'épitope. Les lymphocytes B se lient directement aux épitopes conformationnels grâce aux immunoglobulines de leur membrane. Les lymphocytes T reconnaissent les épitopes séquentiels présentés par les cellules présentatrices d'antigènes. L'antigène peut être exogène, c'est-à-dire qu'il est étranger à l'individu (dans ce cas, il peut être allogénique : issu d'un individu de la même espèce ; ou xénogénique : issu d'autres espèces), ou il peut être endogène, c'est-à-dire un antigène propre à l'hôte

(auto-antigènes). L'antigène est de préférence un antigène de microorganisme, de plante, d'algue, de microalgue, de bactérie, de virus, de parasite, de levure, de champignon, d'insecte, d'animal, ou de tumeur ; de préférence un antigène d'un pathogène eucaryote ou procaryote, ou d'un cancer ; de préférence un antigène protéique, un lipide ou un sucre de bactérie, de virus, de parasite, de levure, de champignon ou de tumeur.

- [0102] Le terme antigène englobe les antigènes natifs et leurs dérivés (par exemple, les antigènes mutés et/ou modifiés), de préférence à condition que ce dérivé soit capable d'être la cible d'une réponse immunitaire.
- [0103] Les différentes catégories d'antigènes sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le domaine (tels que G. J. V. Nossal, G L Ada, *Antigens, Lymphoid Cells and the Immune Response*, Academic Press, 1971 ; Marc H. V. Van Regenmortel, *Structure of Antigens*, Volume 3 CRC Press, 20 déc. 1995 ; Edouard Drouhet, Garry T. Cole, Louis De Repentigny, Jean Latge, *Fungal Antigens: Isolation, Purification, and Detection*, Springer Science & Business Media, 11 nov. 2013 ; Graziano D.F., Finn O.J. (2005) Tumor Antigens and Tumor Antigen Discovery. In: Khleif S.N. (eds) *Tumor Immunology and Cancer Vaccines*. Cancer Treatment and Research, vol 123. Springer, Boston, MA; Wang M, Claesson MH, *Methods Mol Biol*. 2014;1184:309-17. Classification of human leukocyte antigen (HLA) supertypes ; ainsi que les bases de données spécialisées telles que décrites dans Galperin, Fernández-Suárez, Rigden, *The 24th annual Nucleic Acids Research database issue: a look back and upcoming changes*, NAR, Volume 45, Issue D1, January 2017, Pages D1–D11; en particulier la base de données PMAPP, une base de données des autoantigènes humains (disponible notamment sur le site aagatlas.ncpsb.org)).
- [0104] Tel qu'il est utilisé ici, un "**fragment d'antigène**" est toute partie d'un antigène, de préférence à condition que ce fragment/cette partie soit capable d'être la cible d'une réponse immunitaire (par exemple, épitopes, domaines immunogènes, etc.). Dans le cas d'un antigène protéique, le fragment antigénique comprend de préférence au moins 6 résidus d'acides aminés consécutifs de l'antigène (de préférence au moins 8 résidus d'acides aminés consécutifs de l'antigène, de préférence au moins 10, de préférence au moins 15, de préférence au moins 20, de préférence au moins 30 résidus d'acides aminés de l'antigène).
- [0105] Par « **toxine** » on entend une substance toxique pour un ou plusieurs organismes vivants. Une toxine est typiquement synthétisée par un organisme vivant (bactérie, champignon vénéneux, insecte ou serpent venimeux), auquel elle confère son pouvoir pathogène. Les toxines produites par des bactéries sont appelées bactériotoxines, celles par les champignons sont dénommées mycotoxines, celles produites par les plantes

sont appelées phytotoxines, celles produites par les algues sont appelées phycotoxines, celles par les animaux sont dénommées toxines animales. La toxine peut être une molécule chimique, un peptide, une protéine, une glycoprotéine, un sucre, un oside, un lipide, un acide nucléique, ou une combinaison quelconque de ceux-ci. Plusieurs familles de bactéries sécrètent des biotoxines (exotoxines) dans les tissus qu'elles colonisent. D'autres bactéries (Gram négatif) conservent en elles-mêmes la plus grande partie des composés toxiques, qui ne sont libérés que lors de la lyse cellulaire, sous l'action de moyens chimiques, physiques ou mécaniques (les endotoxines). Les végétaux toxiques produisent des toxines via leurs métabolites secondaires : ce sont des molécules qui, à l'inverse des toxines primaires (protéines, lipides, glucides, acides aminés...) sont produites en dehors des voies métaboliques nécessaires à assurer la survie (donc des métabolites primaires). On peut classer les toxines végétales en trois groupes : les phénols, les azotés et les terpènes. La toxine peut être une neurotoxine (une toxine agissant sur le système nerveux), une myotoxine (agissant sur la contraction des muscles, notamment les cardiotoxines sur le cœur et d'autres comme la strychnine sur les muscles respiratoires), une hémotoxine (agissant sur le sang), une cytotoxine (agissant sur les cellules), une dermatotoxine (agissant sur la peau et les muqueuses), une hépatotoxine (agissant sur le foie), une néphrotoxine (agissant sur le rein), une entérotoxine (agissant sur le tube digestif) etc. La toxine peut être une anatoxine ; c'est-à-dire une toxine qui a été traitée de manière à conserver son pouvoir antigénique et perdre son pouvoir toxique. La toxine est de préférence une toxine de microorganisme, de plante, d'algue, de microalgue, de bactérie, de virus, de parasite, de levure, de champignon, d'insecte, d'animal, ou de tumeur ; de préférence une toxine d'un pathogène eucaryote ou procaryote, ou d'un cancer.

- [0106] Les différentes catégories de toxines sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le domaine (tels que Michael W. Parker, *Protein Toxin Structure*, Springer Science & Business Media, 29 juin 2013 ; Michael R. Dobbs, *Clinical Neurotoxicology E-Book: Syndromes, Substances, Environments*, Elsevier Health Sciences, 22 juil. 2009 ; Walker AA, Robinson SD, Yeates DK, Jin J, Baumann K, Dobson J, Fry BG, King GF. *Entomovenomics: The evolution, biology and biochemistry of insect venoms*. *Toxicon*. 2018 Nov;154:15-27; Vilariño N, Louzao MC, Abal P, Cagide E, Carrera C, Vieytes MR, Botana LM. *Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection*. *Toxins (Basel)*. 2018 Aug 9;10(8) ; ainsi que les bases de données spécialisées telles que décrites dans Galperin, Fernández-Suárez, Rigden, *The 24th annual Nucleic Acids Research database issue: a look back and upcoming changes*, *NAR*, Volume 45, Issue D1, January 2017, Pages D1–D11; en particulier la base de données *Comparative Toxicogenomics Database*, telle que décrite dans Davis, Grondin

Murphy, Johnson, Lay, Lennon-Hopkins, Saraceni-Richards, Sciaky, King, Rosenstein, Wiegers, Mattingly, The Comparative Toxicogenomics Database: update 2013, NAR, Volume 41, Issue D1, 1 January 2013, Pages D1104–D1114 (disponible notamment sur le site ctdbase.org)).

[0107] Tel qu'utilisé ici, un "**fragment de toxine**" est toute partie d'une toxine, de préférence à condition que ce fragment/cette partie soit capable d'être toxique pour un organisme et/ou une cellule. Dans le cas d'une toxine protéique, le fragment de toxine comprend de préférence au moins 6 résidus d'acides aminés consécutifs de la toxine (de préférence au moins 8 résidus d'acides aminés consécutifs de la toxine, de préférence au moins 10, de préférence au moins 15, de préférence au moins 20, de préférence au moins 30 résidus d'acides aminés de la toxine).

[0108] Par « **récepteur** » on entend une molécule de la membrane cellulaire ou du cytoplasme ou du noyau cellulaire qui se lie spécifiquement à un facteur spécifique (un ligand, tels un neurotransmetteur, une hormone, ou une autre substance), induisant une réponse cellulaire à ce ligand. Les modifications du comportement du récepteur induites par le ligand conduisent à des modifications physiologiques qui constituent les « effets biologiques » du ligand. Les récepteurs peuvent comprendre au moins : un peptide, une protéine, une glycoprotéine, un sucre, un oside, un lipide, un acide nucléique, ou une combinaison quelconque de ceux-ci. Les récepteurs sont en général des protéines ou des protéines mixtes (protéines modifiées et/ou associées à une autre molécule). Le récepteur peut être un récepteur de la partie externe de la membrane plasmique, un récepteur transmembranaire enchâssé dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires (en général une protéine transmembranaire, agissant par exemple comme récepteur aux hormones et aux neurotransmetteurs - Ces récepteurs sont soit couplés à une protéine G soit porteurs d'une activité enzymatique ou de canal ionique qui permettent l'activation des voies métaboliques de la transduction du signal en réponse à la fixation du ligand), ou un récepteur intracellulaire (ces récepteurs peuvent parfois pénétrer dans le noyau de la cellule pour y moduler l'expression de gènes spécifiques, en réponse à l'activation par le ligand). Le récepteur est de préférence un récepteur de microorganisme, de plante, d'algue, de microalgue, de bactérie, de virus, de parasite, de levure, de champignon, d'insecte, d'animal, ou de tumeur ; de préférence un récepteur d'un pathogène eucaryote ou procaryote, ou d'un cancer ; de préférence un récepteur protéique ou glycoprotéique de bactérie, de virus, de parasite, de levure, de champignon ou de tumeur. Les différentes catégories de récepteurs sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le domaine (tels que Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz, Graham Johnson Cell Biology E-Book, Elsevier Health Sciences, 1 nov. 2016 ; Mohammed Zourob, Recognition Receptors in

Biosensors, DOI 10.1007/978-1-4419-0919-0, Springer-Verlag New York 2010 ; Abbas, Lichtman, Pillai, Cellular and Molecular Immunology E-Book, Elsevier Health Sciences, 22 août 2014 ; ainsi que les bases de données spécialisées telles que décrites dans Galperin, Fernández-Suárez, Rigden, The 24th annual Nucleic Acids Research database issue: a look back and upcoming changes, NAR, Volume 45, Issue D1, January 2017, Pages D1–D11; en particulier la base de données GPCRdb, , telle que décrite dans Isberg V., Mordalski S., Munk C., Rataj K., Harpsøe K., Hauser A.S., Vroeling B., Bojarski A.J., Vriend G., Gloriam D.E.. GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors. Nucleic Acids Res. 2016 ; 44:D356–D364 (disponible notamment sur le site gpcrdb.org)).

[0109] Tel qu'utilisé ici, un "**fragment de récepteur**" est toute portion d'un récepteur, de préférence à condition que ce fragment/portion soit capable de se lier spécifiquement à un facteur spécifique (par exemple un ligand, une hormone ou une autre substance). Dans le cas d'un récepteur protéique, le fragment de récepteur comprend de préférence au moins 6 résidus d'acides aminés consécutifs du récepteur (de préférence au moins 8 résidus d'acides aminés consécutifs du récepteur, de préférence au moins 10, de préférence au moins 15, de préférence au moins 20, de préférence au moins 30 résidus d'acides aminés du récepteur).

[0110] Par « **enzyme** » on entend une protéine dotée de propriétés catalytiques. Pratiquement toutes les biomolécules capables de catalyser des réactions chimiques dans les cellules sont des enzymes ; certaines biomolécules catalytiques sont cependant constituées d'ARN et sont donc distinctes des enzymes : ce sont les ribozymes. Une enzyme agit en abaissant l'énergie d'activation d'une réaction chimique, ce qui accroît la vitesse de réaction. L'enzyme n'est pas modifiée au cours de la réaction. Les molécules initiales sont les substrats de l'enzyme, et les molécules formées à partir de ces substrats sont les produits de la réaction. Les enzymes sont notamment caractérisées par leur très grande spécificité. De plus, une enzyme a la caractéristique d'être réutilisable.

[0111] Les enzymes sont généralement des protéines globulaires qui agissent seules ou en complexes de plusieurs enzymes ou sous-unités. Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques repliées pour former une structure tridimensionnelle correspondant à leur état natif.

[0112] Les enzymes sont des molécules bien plus grandes que leurs substrats. Leur taille peut varier d'une cinquantaine-centaine de résidus à plus de 2 000 résidus. Seule une toute petite partie de l'enzyme — entre deux et quatre résidus le plus souvent, parfois plus — est directement impliquée dans la catalyse, ce qu'on appelle le site catalytique (ou **domaine catalytique**). Ce dernier peut être situé à proximité d'un ou plusieurs **sites de liaison**, au niveau desquels le(s) substrat(s) est(sont) lié(s) et orienté(s) afin de

permettre la catalyse de la réaction chimique. Le site catalytique et les sites de liaison forment le **site actif** de l'enzyme.

[0113] Les enzymes remplissent un grand nombre de fonctions au sein des êtres vivants. Elles peuvent par exemple intervenir dans des mécanismes de transduction de signal et de régulation des processus cellulaires, dans la génération de mouvements, dans le transport actif transmembranaire, dans la digestion, dans le métabolisme, dans le système immunitaire, dans des mécanismes de digestion ou coupure d'acides nucléiques en encore de production d'acides nucléiques (appelées ici « **enzymes agissant sur les acides nucléiques** »), dans des mécanismes de conversion de prodrogue (conversion de prodrogue en drogue). L'enzyme est de préférence une enzyme procaryote, eucaryote ou virale, de préférence une enzyme d'un animal, d'un végétal, d'une algue, d'une microalgue, d'un insecte, d'un microorganisme, d'une bactérie, d'un parasite, d'une levure, d'un champignon ou d'un virus, de préférence encore une enzyme de mammifère, telle qu'une enzyme humaine. Les différentes catégories d'enzymes sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le domaine (tels que Schomburg D., Schomburg I., Springer Handbook of Enzymes. 2 edn. Heidelberg: Springer; 2001-2009 ; Liébecq C., IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB) Biochem. Mol. Biol. Int. 1997;43:1151–1156; IUBMB (1992), Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego; ainsi que les bases de données spécialisées telles que décrites dans Schomburg D, Schomburg I. Methods Mol Biol. 2010;609:113-28. Enzyme databases ; en particulier la base de données BRENDA (disponible notamment sur le site brenda-enzymes.org), telle que décrite par exemple par Chang A, Schomburg I, Placzek S, Jeske L, Ulbrich M, Xiao M, Sensen CW, Schomburg D, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43. Epub 2014 Nov 5. BRENDA in 2015: exciting developments in its 25th year of existence).

[0114] Tel qu'utilisé ici, un "**fragment d'enzyme**" est toute portion d'une enzyme, de préférence à condition que ce fragment/portion soit capable d'avoir une activité enzymatique. Dans le cas d'une enzyme protéique, le fragment enzymatique comprend de préférence au moins 6 résidus d'acides aminés consécutifs de l'enzyme (et est de préférence un site catalytique de l'enzyme) (de préférence au moins 8 résidus d'acides aminés consécutifs de l'enzyme, de préférence au moins 10, de préférence au moins 15, de préférence au moins 20, de préférence au moins 30 résidus d'acides aminés de l'enzyme).

[0115] Par « **activité enzymatique** » ou « **activité catalytique** » ou encore « **activité** » d'une enzyme, on entend l'efficacité d'une enzyme à convertir un substrat en produit dans un environnement donné. L'efficacité de l'enzyme prend en compte ici la vitesse

de conversion du substrat en produit par l'enzyme et le taux de conversion du substrat en produit par l'enzyme. Par « **taux de conversion du substrat en produit par l'enzyme** » on entend ici le ratio entre la quantité de produit final obtenu par rapport à la quantité initiale de substrat pour une quantité définie d'enzyme. Par exemple, une activité enzymatique au sens de l'invention peut être exprimée en quantité de phloroglucinol produit dans un volume donné (en g/L).

- [0116] Par « **hormone** » on entend une substance chimique biologiquement active, en général synthétisée par une cellule glandulaire (généralement suite à une stimulation) et sécrétée dans le milieu intérieur où elle circule (par voie sanguine, par la lymphe ou par la sève). Elle transmet un message sous forme chimique (en général en agissant sur des récepteurs spécifiques d'une cellule cible) et joue donc un rôle de messenger dans l'organisme. Elle est capable d'agir à très faible dose.
- [0117] L'hormone est avantagement une hormone végétale ou animale. Les hormones végétales sont également appelées phytohormones ou facteurs de croissance. Elles ont souvent comme fonction d'assurer la croissance de la plante ou sa morphogénèse. Les hormones animales sont dans la plupart des cas produites par le système endocrinien (une glande endocrine ou un tissu endocrinien).
- [0118] Avantagement, l'hormone est une hormone de vertébrés, de préférence choisie parmi les classes chimiques suivantes :
- [0119] – Les hormones dérivées d'amines, qui sont constituées d'un seul acide aminé (la tyrosine ou le tryptophane) mais sous une forme dérivée.
- Les hormones peptidiques, qui sont des chaînes d'acides aminés, donc des protéines, appelées peptides pour les plus courtes.
- Les hormones stéroïdes, qui sont des stéroïdes dérivés du cholestérol.
- Les hormones à base de lipides et de phospholipides.
- [0120] L'hormone est de préférence choisie parmi les hormones peptidiques ou protéiques, les hormones dérivées d'amines, les hormones stéroïdes et les hormones lipidiques. L'hormone est de préférence une hormone d'un animal ou d'un végétal, de préférence une hormone de mammifère, de préférence une hormone humaine. Les différentes catégories d'hormones sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le domaine (tels que Davies P.J. (2010) *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions*. In: Davies P.J. (eds) *Plant Hormones*. Springer, Dordrecht ; AW Norman, G Litwack, *Hormones*, Academic Press, 1997; A Kastin, *Handbook of biologically active peptides*, Academic Press, 2013).
- [0121] Tel qu'utilisé ici, un "**fragment d'hormone**" est toute portion d'une hormone, de préférence à condition que ce fragment/portion soit capable de stimuler et/ou d'inhiber un processus biologique. Dans le cas d'une hormone protéique, le fragment d'hormone

comprend de préférence au moins 6 résidus d'acides aminés consécutifs de l'hormone (de préférence au moins 8 résidus d'acides aminés consécutifs de l'hormone, de préférence au moins 10, de préférence au moins 15, de préférence au moins 20, de préférence au moins 30 résidus d'acides aminés de l'hormone).

[0122] Le terme "**ligand**" désigne généralement une substance qui se lie à un récepteur d'une cellule et induit un signal biologique. Le terme ligand englobe notamment les termes « **signal d'adressage ou de ciblage ou de transport** », « **molécule de signalisation** », « **signal** », et « **signal cellulaire** ». Des exemples de ligands comprennent les séquences d'adressage de peptide et de protéine, les oligosaccharides, les molécules permettant le transport et/ou l'internalisation cellulaire, les neurotransmetteurs, les ligands de récepteurs (les récepteurs étant tels que définis ci-dessus), ainsi que les molécules de reconnaissance cellulaire telles que les ligands des récepteurs Toll Like ou les ligands des récepteurs des lectines de type C. Une séquence d'adressage est une courte séquence d'acide aminés, généralement situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, servant à désigner les protéines devant être adressées, et indiquer leur destination. Ainsi, le signal d'adressage ou de ciblage ou de transport peut être un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport au/vers le noyau ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport au/vers le cytoplasme ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport au/vers le cytosol ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport à/vers la membrane cellulaire ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport aux/vers les mitochondries ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport aux/vers les péroxysomes ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport aux/vers les lysosomes ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport au/vers le réticulum endoplasmique ; un signal d'adressage ou de ciblage ou de transport des voies de sécrétion ; et un ligand d'un récepteur, de préférence un récepteur membranaire ou transmembranaire, de préférence un récepteur membranaire ou transmembranaire d'une membrane choisie parmi une membrane cellulaire, une membrane extracellulaire, une membrane cytoplasmique ou une membrane nucléaire. Le signal d'adressage ou de ciblage ou de transport peut comprendre au moins : un peptide, une protéine, une glycoprotéine, un sucre, un oside, un lipide, un acide nucléique, ou une combinaison quelconque de ceux-ci. De préférence, le signal d'adressage ou de ciblage ou de transport comprend au moins un peptide, une protéine, une glycoprotéine, ou un acide nucléique. Le signal est de préférence un signal procaryote, eucaryote ou viral, de préférence un signal d'un animal, d'un végétal, d'une algue, d'une microalgue, d'un microorganisme, d'une bactérie, d'un parasite, d'une levure, d'un champignon, d'un insecte, d'un virus, ou d'un cancer ; de préférence encore un signal de mammifère, tel qu'un signal humain. Les différentes catégories de signaux sont bien connues de l'homme du métier, qui pourra notamment se référer aux ouvrages de référence dans le

domaine (tels que Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz, Graham Johnson Cell Biology E-Book, Elsevier Health Sciences, 1 nov. 2016 ; Mohammed Zourob, Recognition Receptors in Biosensors, DOI 10.1007/978-1-4419-0919-0, Springer-Verlag New York 2010 ; Abbas, Lichtman, Pillai, Cellular and Molecular Immunology E-Book, Elsevier Health Sciences, 22 août 2014).

- [0123] Un "**fragment de ligand**" est toute portion d'un ligand, de préférence à condition que ce fragment/portion soit capable de se lier à un récepteur d'une cellule et d'induire un signal biologique. Dans le cas d'un ligand protéique, le fragment de ligand comprend de préférence au moins 6 résidus d'acides aminés consécutifs du ligand (de préférence au moins 8 résidus d'acides aminés consécutifs du ligand, de préférence au moins 10, de préférence au moins 15, de préférence au moins 20, de préférence au moins 30 résidus d'acides aminés du ligand).
- [0124] Par « **nanoparticule** » on entend un objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ (par exemple tel que défini par la norme ISO TS/27687).
- [0125] Par « **groupement fonctionnel** » ou « **groupe fonctionnel** » on entend un groupement réactif, c'est à dire possédant la capacité de former au moins une réaction chimique, biologique, biochimique, enzymatique, ou toute combinaison de celles-ci, avec une autre molécule. Par « groupement fonctionnel permettant la liaison à un agent » on entend un groupement fonctionnel possédant la capacité de former au moins une réaction chimique biologique, biochimique, enzymatique, ou toute combinaison de celles-ci, avec un agent (notamment choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci).
- [0126] Le groupement fonctionnel peut par exemple comprendre, ou consister essentiellement en, ou consister en, un peptide étiquette (« peptide tag » en anglais), un groupement chimique (tel qu'une fonction cliquable, un groupement de couplage (« crosslinking group » en anglais), et toute combinaison de ceux-ci), un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une étiquette d'affinité (par exemple la biotine, la streptavidine, la protéine de liaison à la chitine (CBP), la protéine de liaison au maltose (MBP), le Strep-tag, la glutathione-S-transférase (GST), le poly(His) tag, etc.), ou toute combinaison de ceux-ci.
- [0127] Par « **fonction cliquable** », ou « chimie-click » ou encore « chimie bio-orthogonale rapide », on entend un groupement chimique capable de réagir avec un autre groupement chimique, en l'absence de solvant, à un pH physiologique, sans formation de résidu ou de sous-produit. Des exemples de fonctions cliquables incluent notamment, sans y être limités, les groupements azoture, les groupements alcyne (e.g. acétylène), et toute combinaison de ceux-ci. La fonction cliquable peut notamment être

choisie parmi un groupement N-hydroxysuccinimide (NHS), dibenzocyclooctyne (DBCO), tétrazine, méthyl-tétrazine, et toute combinaison de ceux-ci.

[0128] Tel qu'utilisé ici, les termes « **peptide étiquette** », ou "**étiquette peptidique**", ou « **peptide tag** », se réfèrent à une séquence peptidique comprise entre 6 et 400 acides aminés (de préférence entre 8 et 300 acides aminés, plus préférablement entre 10 et 200 acides aminés, plus préférablement entre 12 et 82 acides aminés). Parmi les exemples d'étiquettes peptidiques, on peut citer les étiquettes peptidiques d'affinité, les étiquettes peptidiques de solubilisation, les étiquettes peptidiques de chromatographie, les étiquettes peptidiques d'épitope, les étiquettes peptidiques de fluorescence, etc. Les étiquettes peptidiques d'affinité sont généralement ajoutées aux protéines afin qu'elles puissent être purifiées à partir de leur source biologique brute à l'aide d'une technique d'affinité. Il s'agit notamment de la protéine de liaison à la chitine (CBP), de la protéine de liaison au maltose (MBP), du Strep-tag, de la glutathione-S-transférase (GST), du poly(His) tag, etc. Les étiquettes peptidiques de solubilisation sont particulièrement utilisées pour les protéines exprimées dans des espèces déficientes en chaperons, comme *E. coli*, pour aider au repliement correct des protéines et les empêcher de précipiter. Il s'agit notamment de la thiorédoxine (TRX) et du poly(NANP). Certaines étiquettes peptidiques d'affinité ont un double rôle d'agent de solubilisation, comme la MBP et la GST. Les étiquettes chromatographiques sont utilisées pour modifier les propriétés chromatographiques de la protéine afin de permettre une résolution différente dans une technique de séparation particulière. Elles consistent souvent en des acides aminés polyanioniques, comme le FLAG-tag. Les étiquettes épitopes sont de courtes séquences peptidiques choisies parce que des anticorps de haute affinité peuvent être produits de manière fiable dans de nombreuses espèces différentes. Elles sont généralement dérivées de gènes viraux. Les étiquettes épitopes comprennent l'étiquette ALFA, l'étiquette V5, l'étiquette Myc, l'étiquette HA, l'étiquette Spot, l'étiquette T7, l'étiquette NE, etc. Les étiquettes de fluorescence sont notamment utilisées pour donner une lecture visuelle d'une protéine. La GFP et ses variantes sont les étiquettes de fluorescence les plus couramment utilisés. Les peptides étiquettes peuvent permettre une modification enzymatique spécifique (comme la biotinylation par la biotine ligase) ou une modification chimique (comme la réaction avec FLAsH-EDT2 pour l'imagerie par fluorescence). Les peptides étiquettes peuvent être combinés, notamment afin de relier les protéines à plusieurs autres composants. Les étiquettes peptidiques comprennent également les étiquettes peptidiques covalentes. Des exemples de peptides étiquettes covalents incluent, mais ne sont pas limités à :

- [0129] – Isopeptag (se liant de manière covalente à la protéine pilin-C);
- SpyTag (se liant de manière covalente à la protéine SpyCatcher) ;
- SnoopTag (se liant de manière covalente à la protéine SnoopCatcher) ;

- SnooTagJr (se liant de manière covalente à la protéine SnooCatcher ou à la protéine DogTag (medié par la SnooLigase)) ;
- DogTag (se liant de manière covalente à la protéine SnooTagJr, médié par la SnooLigase),
- SdyTag (se liant de manière covalente à la protéine SdyCatcher) ;
- Tout variant de ceux-ci.

[0130] Les variants des peptides étiquettes sont bien décrits dans la littérature, sont disponibles pour la personne de métier et n'ont pas besoin d'être décrits en détail dans le présent document.

[0131] Par "**maladie**" ou « affection » ou "trouble" ou "pathologie" (ces termes sont ici considérés comme étant synonymes), on entend une altération des fonctions ou de la santé d'un organisme vivant. Il s'agit aussi bien de la maladie, se référant à l'ensemble des altérations de santé, que d'une maladie, qui désigne alors une entité particulière caractérisée par des causes, des symptômes, une évolution et des possibilités thérapeutiques propres.

[0132] Par "**prévention**" ou "prévention d'une maladie" ou "prévention de l'apparition d'une maladie" on entend la réduction du risque d'apparition, de développement ou d'amplification d'une maladie, des causes d'une maladie, des symptômes d'une maladie, des effets (ou conséquences, de préférence les effets/conséquences néfastes, délétères) d'une maladie, ou toute combinaison de ceux-ci ; et/ou retarder l'apparition, le développement ou l'amplification d'une maladie, les causes d'une maladie, les symptômes d'une maladie, les effets (ou les conséquences, de préférence les effets/conséquences délétères) d'une maladie, ou toute combinaison de ceux-ci. La prévention comprend notamment les traitements préventifs.

[0133] Par "**traitement**" ou "traitement d'une maladie" on entend la réduction, l'inhibition et/ou la disparition d'une maladie, des causes d'une maladie, des symptômes d'une maladie, des effets (ou conséquences, de préférence les effets/conséquences nocifs, délétères) d'une maladie, ou toute combinaison de ceux-ci. Le traitement est de préférence un traitement curatif.

[0134] Un "traitement" ou une "thérapie" comprend, sans s'y limiter, une ou plusieurs molécules et/ou des médicaments (y compris tout type de molécule ou de médicament, comme les composés chimiques ou biologiques, les anticorps, les antigènes, la thérapie génique, la thérapie cellulaire, l'immunothérapie, la chimiothérapie, toute combinaison de ceux-ci, etc.), et/ou d'autres traitements (tels que la radiothérapie, l'immunothérapie, la chimiothérapie, la chirurgie, l'endoscopie, la radiologie interventionnelle, l'oncologie physique, la photothérapie, la luminothérapie, l'ultrasonothérapie, la thermothérapie, la cryothérapie, l'électrothérapie, l'électroconvulsivothérapie, l'oxygénothérapie, la ventilation assistée, le massage hydrothérapeutique, la transplantation d'organes/de tissus/

de fluides, l'implantation, et toute combinaison de ceux-ci, etc.) Une thérapie peut être administrée par différents modes d'administration. L'homme du métier sait comment sélectionner le ou les modes d'administration les plus appropriés en fonction de la thérapie, de la maladie et du sujet à traiter. Par exemple, les modes d'administration comprennent, sans s'y limiter, l'administration orale, l'administration par injection dans une veine (intraveineuse, IV), dans un muscle (intramusculaire, IM), dans l'espace autour de la moelle épinière (intrathécale), sous la peau (sous-cutanée, sc) ; administration sublinguale ; administration buccale ; administration rectale ; administration vaginale ; voie oculaire ; voie otique ; administration nasale ; par inhalation ; par nébulisation ; administration cutanée, topique ou systémique ; administration transdermique.

- [0135] "**Médicament**" ou "drogue" désigne toute substance ou composition présentée comme ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Un médicament comprend donc toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou l'animal ou administrée à ceux-ci dans le but d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. Le terme médicament inclut notamment les vaccins.
- [0136] Les termes "**thérapeutique**" ou "utilisations thérapeutiques" dans le contexte de la présente invention couvrent les utilisations "prévention", "traitement" et "vaccin".
- [0137] Une "**quantité thérapeutiquement efficace**" correspond à la quantité de chaque entité active qui est suffisante pour produire un résultat bénéfique pour la santé. Une "quantité immunologiquement efficace" correspond à la quantité de chaque entité active qui est suffisante pour produire une réponse immunitaire détectable. L'entité active est par exemple un principe actif, un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, ou toute combinaison de ceux-ci.
- [0138] Tel qu'utilisé ici, un "**excipient pharmaceutiquement acceptable**" ou « support pharmaceutiquement acceptable » est destiné à inclure tous les supports, solvants, diluants, excipients, adjuvants, véhicules, milieux de dispersion, enrobages, agents antibactériens et antifongiques, et agents retardateurs d'absorption, et autres, compatibles avec l'administration chez un sujet notamment chez un animal, et en particulier chez l'homme. Les supports appropriés pour une utilisation dans le présent document sont bien connus de l'art (voir par exemple l'édition la plus récente de Remington : The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins). Des exemples non limitatifs d'excipients comprennent l'eau, le NaCl, les solutions salines, les solutions de saccharides (par exemple le glucose, le tréhalose, le saccharose, le dextrose, etc.), le Ringer lacté, les alcools, les huiles, les gélatines, les hydrates de carbone tels que le lactose, l'amylose ou l'amidon, les esters d'acides gras,

l'hydroxyméthylcellulose, etc. On peut notamment citer comme adjuvant les agents de gonflement comme par exemple un sucre tel que le lactose, le saccharose, le tréhalose, le sorbitol, le glucose, le raffinose, le mannitol, de préférence le lactose, le saccharose, le tréhalose, le glucose, ou le mannitol, un acide aminé tel que l'arginine, la glycine, ou l'histidine, de préférence la glycine, ou des polymères de type dextrane ou polyéthylène glycol, ou leurs mélanges.

[0139] Par « **sujet** » ou « **patient** », on entend un individu humain ou un animal différent d'un humain. Le sujet est par exemple un humain ou un animal susceptible de contracter une maladie, susceptible d'être atteint d'une maladie, ou souffrant d'une maladie. Le sujet est de préférence un être humain. Le sujet peut être un enfant (sujet humain âgé de 16 ans ou moins) ou un adulte (sujet humain âgé de plus de 16 ans). Par « **sujet sain** » on entend un sujet qui ne souffre pas de la maladie considérée. Dans le cadre de la présente invention, un sujet sain est de préférence un sujet qui ne souffre d'aucune maladie. Par « **sujet de référence** » on entend un sujet qui souffre d'une maladie connue, à un stade connu.

[0140] Par "**échantillon biologique**" ou "**prélèvement**" d'un sujet, on entend un organe entier ou un tissu ou une partie d'un tel organe ou tissu, un fluide ou une fraction d'un tel fluide, des cellules ou des composants cellulaires, obtenus de ce sujet, ainsi qu'un homogénat, un lysat ou un extrait préparé à partir de ceux-ci. En particulier, un "échantillon biologique" ou "prélèvement" est de préférence tout tissu (de préférence des portions ou fractions de celui-ci) qui peut servir à détecter une maladie, y compris, mais sans s'y limiter, du plasma, du sang, de la lymphe, du sérum, de l'urine, du mucus, de la salive, un échantillon du système nerveux central (SNC ; tel qu'un échantillon de cerveau ou un échantillon de moelle épinière, etc.), un échantillon de voie respiratoire (tel qu'un échantillon de poumon, etc.), un échantillon de glandes salivaires, un échantillon nasopharyngé, un échantillon oropharyngé, un échantillon du système digestif (par exemple de colon, d'intestin, etc.), un échantillon de peau, un échantillon d'organe (par exemple de foie, de rein, de rate, etc.), etc.

[0141] L'échantillon biologique peut avoir été préalablement obtenu par toute technique connue dans la profession. Ces techniques comprennent, par exemple, le prélèvement à l'aide d'un écouvillon, d'une aiguille ou d'une seringue, la chirurgie (telle que la chirurgie stéréotaxique), la ponction, l'explant, l'excision, la biopsie. Par "excision", on entend une procédure chirurgicale consistant à couper (exciser) une partie plus ou moins large ou profonde du tissu, de préférence une anomalie ou une croissance du tissu. Une excision peut être pratiquée pour enlever et/ou analyser une tumeur cancéreuse ou suspecte. Le terme "biopsie" désigne ici un échantillon de cellules ou de tissus prélevé pour analyse. Plusieurs types de procédures de biopsie sont connus et pratiqués sur le terrain. Les types les plus courants comprennent (1) la biopsie inci-

sionnelle, dans laquelle seul un échantillon du tissu est prélevé ; (2) la biopsie excisionnelle (ou biopsie chirurgicale), qui consiste à retirer totalement une masse tumorale, réalisant ainsi une procédure thérapeutique et diagnostique ; et (3) la biopsie à l'aiguille, dans laquelle un échantillon de tissu est prélevé à l'aide d'une aiguille, qui peut être grosse ou fine. D'autres types de biopsie existent, comme les frottis ou le curetage, et peuvent également être utilisés pour obtenir l'échantillon. Par conséquent, l'échantillon peut être, par exemple, un explant, une excision, une biopsie, etc. L'échantillon est de préférence obtenu par une procédure peu invasive, telle que la chirurgie stéréotaxique.

[0142] Dans la description détaillée qui suit, les modes de réalisation peuvent être pris seuls ou dans toute combinaison appropriée par l'homme du métier, et les définitions ci-dessus s'appliquent à tous les modes de réalisation décrits ci-dessous ainsi qu'à leurs combinaisons.

Microbulle lipidique

[0143] Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis au point des microbulles innovantes, capables de délivrer dans l'organisme des agents d'intérêt de manière précise et ciblée.

[0144] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les microbulles lipidiques ainsi mises au point possèdent une stabilité significativement améliorée, à la différence des microbulles décrites dans l'art antérieur. De façon remarquable, les données révèlent également que ces microbulles optimisées sont capables de délivrer différents types d'agent thérapeutiques, d'agents de ciblage et/ou d'agents de marquage, y compris des acides nucléiques, de manière plus efficace que les microbulles décrites dans l'art antérieur. Ces microbulles sont notamment capables de traverser de façon active les vaisseaux, la barrière hématoencéphalique (BHE), ou encore le microenvironnement tumoral. Les Inventeurs ont également démontré que l'application localisée d'ultrasons permet de cibler ces microbulles optimisées de manière très précise vers la zone à traiter. Ces données révèlent ainsi le potentiel thérapeutique de ces microbulles lipidiques pour traiter de nombreuses pathologies de manière ciblée, y compris des pathologies du système nerveux central.

[0145] Les données montrent également que ces microbulles optimisées sont des outils de marquage, de détection et d'imagerie.

[0146] Cette grande flexibilité est notamment liée à la formulation originale des microbulles qui consiste en l'utilisation d'un mélange de molécules cationiques telles que des lipophosphoramidates et/ou de la polyéthylimine histidylée.

[0147] La présente invention concerne donc une microbulle lipidique, comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, au moins un composé cationique choisi parmi les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de

ceux-ci. Avantageusement, l'enveloppe de la microbulle lipidique comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, au moins un composé cationique choisi parmi les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci. Ainsi, selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne une microbulle lipidique ayant une enveloppe comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, au moins un composé cationique choisi parmi les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci.

[0148] La microbulle lipidique selon l'invention peut notamment être un agent de contraste ultrasonore.

[0149] Selon un mode de réalisation préféré, la microbulle selon l'invention comprend en outre au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique/pharmacologique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci.

[0150] L'agent thérapeutique/pharmacologique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, et leur combinaison est (sont) de préférence :

- [0151] i. exposé à la surface de la microbulle, ou
- ii. enchâssé dans l'enveloppe lipidique de la microbulle, ou
- iii. incorporé à l'intérieur de la microbulle, ou
- iv. toute combinaison de i à iii.

[0152] L'agent thérapeutique/pharmacologique, l'agent de ciblage, et l'agent de marquage, sont avantageusement tels que définis dans la section « Définitions » ci-dessus.

[0153] Selon un mode de réalisation, ledit au moins un agent comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, ou est(sont) choisi(s) parmi :

- [0154] 1. un acide nucléique ;
- 2. un actif liposoluble ;
- 3. un agent chimio-thérapeutique, tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique ;
- 4. un anticorps ;
- 5. une protéine ;
- 6. un antigène ;
- 7. une toxine ;
- 8. un récepteur
- 9. une enzyme ;
- 10. une hormone ;
- 11. un ligand ;
- 12. un vecteur viral ;
- 13. une nanoparticule, comprenant de préférence au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;

14. tout dérivé de 1) à 13), de préférence tout dérivé fonctionnel de ceux-ci ;
 15. tout fragment de 1) à 14), de préférence tout fragment fonctionnel de ceux-ci ;
et
 16. toute combinaison de 1) à 15).
- [0155] Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, ledit au moins un agent comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, ou est(sont) choisi(s) parmi :
- [0156] a. un acide nucléique ;
- b. un actif liposoluble ;
- c. un agent chimio-thérapeutique, tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytotatique ;
- d. un anticorps ;
- e. un dérivé d'anticorps ;
- f. un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé ;
- g. une protéine ;
- h. un fragment de protéine, tel qu'un peptide (e.g. un peptide de pénétration cellulaire (CPP pour « Cell penetrating peptide »), un antigène, un épitope, un domaine fonctionnel de protéine, etc ;
- i. une nanoparticule, comprenant de préférence (pouvant en outre comprendre) au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci (notamment un agent hydrophile/non liposoluble); et
- j. toute combinaison de a) à i).
- [0157] Les différents types d'agents 1) à 16), et a) à i), tels que listés ci-dessus, sont avantageusement tels que définis dans la section « Définitions » ci-dessus.
- [0158] De préférence, l'acide nucléique 1) et/ou a) comprend, consiste essentiellement en, ou consiste en, un plasmide, un vecteur, un ADN complémentaire (ADNc), un ADN simple brin, un ADN double brin, un ADN comprenant une séquence codant un gène ou un fragment de gène, un ADN codant un gène ou un fragment de gène (de préférence un fragment fonctionnel), un ARN, un ARN double brin, un ARN messager, un ARN non codant, un petit ARN, etc.
- [0159] De préférence, l'agent chimio-thérapeutique 3) ou c) est choisi parmi les agents cytotoxiques, les agents cytostatiques, et les agents cytotoxiques et cytostatiques. L'agent chimio-thérapeutique peut notamment être choisi, sans y être limité, parmi le paclitaxel, la doxorubicine, la gencitabin (e.g. Gemzar), le témozolomide, etc.
- [0160] L'agent de ciblage peut en particulier comprendre, consister essentiellement en, ou consister en, un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une protéine, un fragment de protéine (tel qu'un peptide, un antigène, un épitope, un domaine fonctionnel de protéine, etc.), une nanoparticule (pouvant en

autre comprendre au moins un agent thérapeutique, notamment un agent thérapeutique hydrophile), et toute combinaison de ceux-ci.

[0161] Selon un mode de réalisation avantageux, la microbulle selon l'invention comprend en outre au moins un groupement fonctionnel, notamment un groupement fonctionnel permettant la liaison à au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci. Ledit groupement est de préférence :

- [0162] i. exposé à la surface de la microbulle, ou
- ii. enchâssé dans l'enveloppe lipidique de la microbulle, ou
- iii. incorporé à l'intérieur de la microbulle, ou
- iv. toute combinaison quelconque de i à iii.

[0163] Le groupement fonctionnel est avantageusement tel que défini dans la section « Définitions » ci-dessus.

[0164] Avantageusement, le groupement fonctionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, ou est choisi parmi :

- [0165] a. un peptide étiquette ;
- b. un groupement chimique, de préférence choisi parmi une fonction cliquable, un groupement de couplage, et toute combinaison de ceux-ci ;
- c. un anticorps ;
- d. un dérivé d'anticorps ;
- e. un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé ;
- f. une étiquette d'affinité (par exemple la biotine, la streptavidine, la protéine de liaison à la chitine (CBP), la protéine de liaison au maltose (MBP), le Strep-tag, la glutathione-S-transférase (GST), le poly(His) tag, etc.) ; et
- g. toute combinaison de a) à f).

[0166] Selon un mode de réalisation, le lipophosphoramidate comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, ou est choisi dans le groupe constitué par, un dimyristoyl phosphoramidate (choisi de préférence parmi un dimyristoyl bromure phosphoramidate (de préférence O,O-dimyristoyl-N-[3N-(N méthylimidazolium bromure) propylene] phosphoramidate (composé KLN27)), un dimyristoyl histamine phosphoramidate (de préférence O,O-dimyristoyl(-N-(histamine)phosphoramidate (composé MM30)), et toute combinaison de ceux-ci), un dioleyle phosphoramidate (choisi de préférence dans le groupe des dioleyle méthylimidazolium phosphoramidates (de préférence O,O-dioleyle-N-(3 N-(N-méthylimidazolium iodide) propylene) phosphoramidate (composé KLN25)), et tout mélange de ceux-ci.

[0167] Selon un mode de réalisation, la polyéthyléimine histidylée est couplée à un acide gras, choisi de préférence parmi l'acide stéarique, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide oléique, et toute combinaison de ceux-ci.

- [0168] Avantageusement, la microbulle comprend en outre (en particulier l'enveloppe de la microbulle comprend en outre) un lipide additionnel choisi parmi une dimyristoyl-glycéro-phosphocholine (de préférence la 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC)), une distéaroyl-glycéro-phosphocholine (de préférence la 1,2-distéaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)), une dimyristoyl-glycéro-phosphoéthanolamine-(polyéthylène glycol) (de préférence la 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[methoxy(polyéthylène glycol)-2000] (DMPE-PEG2000)), une distéaroyl-glycéro-phosphoéthanolamine-(polyéthylène glycol) (de préférence la 1,2-distéaroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000)), et une distéaroyl-glycéro-phosphoéthanolamine-[biotinyl(polyéthylène glycol)] (de préférence la 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[biotinyl(polyéthylène glycol)-2000] (DSPE-PEG2000-biotin)), un cholestérol, un beta-sitostérol, un 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), un 1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-3-triméthylammonium propane (DOTAP), un 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (DMG-PEG2000), et toute combinaison de ceux-ci.
- [0169] Selon un mode de réalisation préféré, la microbulle contient en outre un gaz bio-compatible. Le gaz biocompatible est de préférence contenu par l'enveloppe de la microbulle (il est donc à l'intérieur de la microbulle, dans le milieu/la cavité formé(e) par l'enveloppe). Le gaz biocompatible est de préférence choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), un oxyde d'azote (NO), l'hydrogène, le dioxygène, l'hélium, le xénon, l'argon, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci ; de préférence encore choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), le dioxygène, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci. De manière particulièrement préférée, le gaz est choisi dans le groupe des perfluorobutanes (C₄F₁₀).
- [0170] Les données obtenues par les Inventeurs révèlent que les microbulles selon l'invention, telles que définies ci-dessus, sont, de façon remarquable, capables de traverser activement les vaisseaux, la barrière hématoencéphalique (BHE) et/ou le microenvironnement tumoral (notamment lors de l'application localisée d'ultrasons). Les Inventeurs ont également démontré que l'application localisée d'ultrasons permet de cibler ces microbulles de manière très précise vers la zone à traiter, y compris des zones difficiles d'accès telles que le système nerveux central, les vaisseaux, et le microenvironnement tumoral. De plus, les données montrent également que ces mi-

crobulles optimisées sont capables de délivrer efficacement différents types d'agent thérapeutiques, d'agents de ciblage et/ou d'agents de marquage, y compris des acides nucléiques, dans ces zones difficiles d'accès.

- [0171] Ainsi, selon un mode de réalisation avantageux, la microbulle selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle est capable de franchir la barrière hématoencéphalique de façon active et/ou le microenvironnement tumoral de façon active (notamment lors de l'application localisée d'ultrasons).

Méthodes de production d'une microbulle lipidique

- [0172] La présente invention se rapporte également à une méthode de production d'au moins une microbulle selon l'invention, telle que décrite ci-dessus, comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, les étapes suivantes :

- [0173] a. Mélange, dans un récipient, de composés cationiques choisis parmi les lipophosphoramidates, les polyéthyléimines histidylées, et les mélanges quelconques de ceux-ci ; d'éthanol; et optionnellement d'au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
- b. Evaporation du mélange obtenu à l'étape a) pour obtenir un film lipidique et réhydratation du film lipidique pour former une suspension liposomale ; l'intégralité de cette étape pouvant également être réalisée par micro-fluidique ;
- c. Lyophilisation de la suspension liposomale obtenue à l'étape b) ;
- d. Remplacement de l'air contenu dans le récipient contenant le lyophilisat obtenu à l'étape c), par un gaz biocompatible, le gaz étant de préférence choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), un oxyde d'azote (NO), l'hydrogène, le dioxygène, l'hélium, le xénon, l'argon, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci;
- e. Réhydratation du lyophilisat de l'étape d) pour obtenir une solution;
- f. Agitation de la solution obtenue à l'étape d) pour former des microbulles ;
- g. Optionnellement, fonctionnalisation des microbulles par au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci; et/ou fonctionnalisation des microbulles par l'ajout au moins un groupement fonctionnel permettant la liaison à au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci.

- [0174] La microbulle et ses constituants, tels que le lipophosphoramidate, la polyéthyléimine histidylée, l'agent thérapeutique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, le gaz biocompatible, sont avantageusement tels que décrits dans les sections pré-

cédentes (dans la section « Définition » et/ou « Microbulle lipidique »).

- [0175] L'invention concerne en outre une microbulle susceptible d'être obtenue, ou obtenue, ou directement obtenue, par la méthode de production décrite ci-dessus.

Compositions et kits

- [0176] La présente invention concerne en outre un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention, telle que définie ci-dessus.
- [0177] La présente invention concerne également une composition comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, au moins une microbulle selon l'invention, telle que définie ci-dessus, et, optionnellement, un excipient.
- [0178] La présente invention concerne notamment une composition pharmaceutique comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, au moins une microbulle selon l'invention, telle que définie ci-dessus, et, optionnellement, un excipient pharmaceutiquement acceptable.
- [0179] Avantageusement, la composition, notamment la composition pharmaceutique, comprend une quantité thérapeutiquement efficace de microbulle. La concentration en microbulles dans la composition, notamment la composition pharmaceutique, va de préférence de 10^6 à 10^{14} microbulles/ml, de préférence encore de 10^7 à 10^{13} microbulles/ml, de préférence encore de 10^8 à 10^{12} microbulles/ml, de préférence encore de 10^9 à 10^{11} microbulles/ml, de préférence encore la concentration en microbulles dans la composition étant d'environ 10^{10} microbulles/ml.
- [0180] Selon un mode de réalisation, la composition, notamment la composition pharmaceutique, comprend une quantité d'excipient pharmaceutiquement acceptable dans la composition qui va de 5% à 99% en poids par rapport au poids total de la composition, de préférence de 10 à 97% en poids, de préférence de 20 à 95% en poids, de préférence de 30 à 90% en poids, de préférence de 40 à 85% en poids, de préférence de 50 à 80% en poids, de préférence de 60 à 70 % en poids, par rapport au poids total de la composition.
- [0181] Selon un mode de réalisation, le kit, comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en :
- [0182] a) au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ou une composition telle que définie ci-dessus, notamment une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus, dans un premier récipient ;
- [0183] b) au moins un agent thérapeutique, dans un second récipient ;
- [0184] c) optionnellement, au moins un agent de ciblage dans un troisième récipient ;
- [0185] d) optionnellement, au moins un agent de marquage dans un quatrième récipient ; et
- [0186] e) optionnellement, des instructions de préparation et/ou d'utilisation.
- [0187] Avantageusement, le kit comprend en outre des moyens adaptés pour la détection de la présence ou de l'absence de l'agent de marquage dans un échantillon et/ou dans un

sujet.

[0188] La microbulle et ses constituants, tels que le lipophosphoramidate, la poly-éthyléimine histidylée, l'agent thérapeutique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, le gaz biocompatible, sont avantageusement tels que décrits dans les sections précédentes (dans la section « Définition », et/ou « Microbulle lipidique », et/ ou « Méthodes de production d'une microbulle lipidique »).

[0189] Ainsi, de préférence, l'agent thérapeutique et/ou l'agent de ciblage et/ou l'agent de marquage comprend, consiste essentiellement en, ou consiste en, ou est choisi parmi :

- [0190]
1. un acide nucléique ;
 2. un actif liposoluble ;
 3. un agent chimio-thérapeutique, tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytotatique ;
 4. un anticorps ;
 5. une protéine ;
 6. un antigène ;
 7. une toxine ;
 8. un récepteur
 9. une enzyme ;
 10. une hormone ;
 11. un ligand ;
 12. Un vecteur viral ;
 13. une nanoparticule, comprenant de préférence au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
 14. tout dérivé de 1) à 13), de préférence tout dérivé fonctionnel de ceux-ci ;
 15. tout fragment de 1) à 14), de préférence tout fragment fonctionnel de ceux-ci ;
et
 16. toute combinaison de 1) à 15) ;

[0191] de préférence encore parmi un acide nucléique, un actif liposoluble, un agent chimio-thérapeutique, un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une protéine, un fragment de protéine, une nanoparticule, et toute combinaison de ceux-ci.

Utilisations et Méthodes thérapeutiques

[0192] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les microbulles innovantes ici mises au point possèdent la capacité de délivrer dans l'organisme des agents d'intérêt de manière précise et ciblée, y compris dans des zones très difficiles d'accès telles que le système nerveux central, les vaisseaux, et le microenvironnement tumoral. En effet, les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante,

les microbulles lipidiques sont significativement plus stables que les microbulles de l'art antérieur. Elles sont notamment capables de traverser de façon active les vaisseaux, la barrière hématoencéphalique (BHE), ou encore le microenvironnement tumoral. Les Inventeurs ont également démontré que l'application localisée d'ultrasons permet de cibler ces microbulles optimisées de manière très précise vers la zone à traiter. Ces données révèlent ainsi le potentiel thérapeutique de ces microbulles lipidiques pour traiter de nombreuses pathologies de manière ciblée, y compris des pathologies du système nerveux central.

[0193] Les données montrent également que ces microbulles optimisées sont des outils de marquage, de détection et d'imagerie.

[0194] La présente invention fournit donc à la fois des méthodes de traitement puissant et à spectre large de pathologies, ainsi que des méthodes de marquage, pour l'imagerie médicale notamment.

[0195] La présente invention concerne donc une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique ou un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; pour son utilisation comme médicament.

[0196] La présente invention porte également sur une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique ou un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; pour son utilisation comme agent de marquage, notamment comme agent de contraste.

[0197] La présente invention concerne également l'utilisation d'une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition pharmaceutique ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; comme médicament.

[0198] La présente invention porte également sur l'utilisation d'une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition pharmaceutique ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; comme agent de marquage, notamment comme agent de contraste.

[0199] La présente invention concerne également l'utilisation d'une microbulle selon

l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition pharmaceutique ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; pour la fabrication d'un médicament.

[0200] La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition pharmaceutique ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; pour la fabrication d'un agent de marquage, notamment un agent de contraste.

[0201] La présente invention concerne également une méthode de traitement, comprenant l'administration d'une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition pharmaceutique ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; à un sujet (de préférence un sujet en ayant besoin).

[0202] La présente invention se rapporte également à une méthode de marquage, comprenant l'administration d'une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition pharmaceutique ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus ; ou un kit tel que défini ci-dessus ; ou toute combinaison de ceux-ci ; à un sujet (de préférence un sujet en ayant besoin).

[0203] La microbulle et ses constituants, tels que le lipophosphoramidate, la poly-éthyléimine histidylée, l'agent thérapeutique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, le gaz biocompatible, sont avantageusement tels que décrits dans les sections précédentes (dans la section « Définition », et/ou « Microbulle lipidique », et/ ou « Méthodes de production d'une microbulle lipidique »).

[0204] Avantageusement, la composition pharmaceutique et/ou le kit sont tels que décrits ci-dessus dans la section « Compositions et kits ».

[0205] Selon un mode de réalisation préféré, la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est(sont) administré(s) à un sujet en ayant besoin, de préférence en une quantité thérapeutiquement efficace.

[0206] La microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est (sont) de préférence formulée pour être administrée une ou plusieurs fois par la même voie ou par des voies différentes. Toutes les voies d'administration classiques sont applicables

dans le contexte de l'invention, y compris les voies orale, parentérale et topique.

- [0207] Les voies parentérales sont destinées à l'administration sous forme d'injection ou de perfusion et englobent les voies systémiques ainsi que les voies locales. De préférence, la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est formulé(e) pour une ou plusieurs administrations parentérales, et de préférence par voie intra-veineuse (dans une veine), intravasculaire (dans un vaisseau sanguin), intra-artérielle (dans une artère), intradermique (dans le derme), sous-cutanée (sous la peau), intramusculaire (dans le muscle), intrapéritonéale (dans le péritoine), ou intratumorale (dans une tumeur). L'administration peut se faire sous la forme d'une dose unique en bolus ou peut également se faire par une pompe à perfusion en continu.
- [0208] De préférence, la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est formulé(e) pour être administrée par perfusion intraveineuse.
- [0209] Les administrations peuvent utiliser des seringues et des aiguilles classiques (par exemple, des aiguilles d'injection Quadrafuse) ou tout composé ou dispositif disponible dans l'art capable de faciliter ou d'améliorer la délivrance d'une microbulle chez le sujet (par exemple, l'électroporation pour faciliter l'administration intramusculaire). Une alternative est l'utilisation d'un dispositif d'injection sans aiguille (par exemple, le dispositif Biojector TM). Des patchs transdermiques peuvent également être envisagés.
- [0210] Plusieurs doses comprises dans les fourchettes indiquées peuvent être administrées au sujet. En cas d'administrations répétées sur plusieurs jours ou plus, le traitement sera généralement maintenu jusqu'à l'apparition d'un bénéfice clinique observable. Ces doses peuvent être administrées de manière intermittente, par exemple tous les jours, tous les 2 ou 3 jours, toutes les semaines, toutes les 2 semaines, toutes les 3 semaines ou tous les mois (par exemple, de telle sorte que le sujet reçoive d'environ deux à environ vingt doses de la composition). Les doses peuvent également être adaptées à chaque administration (par exemple, une ou plusieurs doses initiales plus élevées suivies d'une ou plusieurs doses plus faibles).
- [0211] Dans un mode de réalisation, la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est administré(e) selon une approche "prime boost" qui comprend des administrations séquentielles d'une ou plusieurs compositions d'amorçage (« priming ») et d'une ou plusieurs compositions de renforcement (« boosting »). Typiquement, les compositions d'amorçage et de renforcement peuvent utiliser le même agent actif (c'est-à-dire la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci), ou peuvent utiliser un agent actif différent (c'est-à-dire la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci). En outre, les compositions d'amorçage et de renforcement peuvent être administrées au niveau de la même zone de l'organisme ou à une zone différente, par la même voie ou par des voies d'administration différentes. Une approche préférée d'amorçage et de renforcement

implique une première injection (par exemple sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intratumorale ou intraveineuse) (amorçage) suivie d'une seconde injection (par exemple sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intratumorale ou intraveineuse) après une période de temps optimale. La présente invention englobe une ou plusieurs administrations de la ou des compositions d'amorçage et/ou de renforcement, avec une préférence pour les voies sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intratumorale, intranasale et intraveineuse. La période de temps séparant les administrations du priming et du boosting varie d'une semaine à 6 mois, avec une préférence pour une semaine à un mois et encore plus pour une période d'une à deux semaines.

- [0212] La microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est(sont) de préférence administré(es) en combinaison avec l'application d'ultrasons, de préférence l'application localisée d'ultrasons, de préférence l'application d'ultrasons localisée sur/vers la zone à traiter et/ou marquer. Les ultrasons sont de préférence administrés à une fréquence allant de 1kHz à 10MHz, de préférence de 10kHz à 9MHz, de préférence de 50kHz à 8MHz, de préférence de 100kHz à 7MHz, de préférence de 150kHz à 6MHz, de préférence de 200kHz à 5MHz, de préférence de 300kHz à 4MHz, de préférence de 400kHz à 3MHz, de préférence de 500kHz à 2MHz, de préférence de 750kHz à 1,5MHz, de préférence de 0,8MHz à 1,2MHz, de préférence encore à une fréquence d'environ 1MHz.
- [0213] Les ultrasons sont de préférence pulsés à une fréquence allant de 1Hz à 10kHz, de préférence de 10Hz à 9kHz, de préférence de 50Hz à 8kHz, de préférence de 100Hz à 7kHz, de préférence de 150Hz à 6kHz, de préférence de 200Hz à 5kHz, de préférence de 300Hz à 4kHz, de préférence de 400Hz à 3kHz, de préférence de 500Hz à 2kHz, de préférence de 750Hz à 1,5kHz, de préférence de 0,8kHz à 1,2kHz, de préférence encore à une fréquence d'environ 1kHz.
- [0214] Les ultrasons sont de préférence administrés à une pression acoustique allant de 100 à 800 kPa (pic négatif), de préférence de 200 à 700 kPa, de préférence de 300 à 600 kPa, de préférence de 400 à 500 kPa.
- [0215] Les ultrasons sont de préférence administrés pendant 30 à 300 secondes, de préférence pendant 40 à 250 secondes, de préférence pendant 50 à 200 secondes, de préférence pendant 60 à 180 secondes, de préférence pendant 80 à 150 secondes, de préférence pendant 90 à 120 secondes.
- [0216] Avantageusement, la méthode d'administration de la microbulle, de la composition, du kit, ou de toute combinaison de ceux-ci, comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, les étapes suivantes :
- [0217] a. Administration de la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, à un sujet, par un mode d'administration approprié (notamment tel que décrit ci-dessus, de préférence par voie parentérale, de préférence encore

par voie intraveineuse) ;

- b. Application des ultrasons sur la zone à traiter et/ou marquer (de préférence selon les conditions de fréquences, de pulse, de pression acoustique et de durée décrites ci-dessus).

[0218] La méthode d'administration peut en outre comprendre des étapes additionnelles de préparation de la microbulle, de la composition, du kit, ou de toute combinaison de ceux-ci, préalable à l'étape a) d'administration ; notamment lorsque les microbulles, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, se présente sous une forme lyophilisée ; lesdites étapes additionnelles étant comme suit :

- [0219] i. Optionnellement, mise en suspension du lyophilisat ;
- ii. Optionnellement, activation des microbulles ;
- iii. Optionnellement, mélange des microbulles à un excipient (notamment un diluant) et incubation pendant 0,5 à 15 minutes, de préférence 1 à 10 minutes, de préférence 1,5 à 8 minutes, de préférence 2 à 6 minutes, de préférence 1 à 5 minutes, de préférence 1 à 3 minutes ;
- iv. Optionnellement mise en présence des microbulles à un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, ou toute combinaison de ceux-ci ; l'agent thérapeutique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, ou toute combinaison de ceux-ci ; pouvant être préalablement mélangé(s) à un excipient (notamment un diluant).

[0220] Selon un mode de réalisation, les microbulles sont activées à l'aide d'un agitateur mécanique ; par exemple avec une agitation comprise entre 2000 et 5000 tours par minute (tpm), de préférence à 4000 tpm ; pour une période comprise entre 10 et 120 secondes, de préférence pendant 45 secondes.

[0221] Selon un mode de réalisation, lorsque la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est utilisée dans un but de marquage, la méthode comprend en outre une étape de détection de la présence ou non de l'agent de marquage.

Utilisations et Méthodes *in vitro*

[0222] Les données révèlent que la microbulle selon l'invention peut être efficacement utilisée comme outil de marquage, de détection et d'imagerie.

[0223] La présente invention fournit donc des méthodes de diagnostic efficace et fiable. Elle permet notamment le diagnostic, le pronostic, la stratification ou encore le suivi de maladies, ou encore d'évaluation de l'efficacité d'un traitement.

[0224] La présente invention se rapporte donc à l'utilisation *in vitro* d'au moins microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition (notamment pharmaceutique) ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition(notamment pharmaceutique) telle que définie ci-dessus ; ou d'un kit tel que

défini ci-dessus ; ou de toute combinaison de ceux-ci ; pour :

- [0225] i. la délivrance d'un agent (thérapeutique, de ciblage, de marquage, ou toute combinaison de ceux-ci) à l'intérieur d'une cellule, ou d'un échantillon biologique ;
- ii. le marquage d'une cellule ou d'un échantillon biologique;
- iii. le diagnostic d'une maladie, chez un sujet susceptible de souffrir d'une maladie ;
- iv. le suivi chez un sujet souffrant d'une maladie;
- v. la stratification d'un sujet souffrant d'une maladie;
- vi. l'évaluation de l'efficacité d'un traitement (notamment curatif) administré à un sujet souffrant d'une maladie;
- vii. détecter la présence ou l'absence d'au moins une microbulle dans un échantillon, notamment un échantillon biologique ;
- viii. déterminer la présence ou l'absence, ou encore la quantité, d'au moins un agent de marquage (notamment un agent de contraste) dans un échantillon, notamment un échantillon biologique ;
- ix. cribler des composés/molécules ayant un effet dans la prévention, le traitement, le marquage, ou toute combinaison de ceux-ci, d'une maladie; ou
- x. une combinaison quelconque de i. à ix.

[0226] La présente invention concerne notamment l'utilisation *in vitro* d'au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou d'une composition (notamment pharmaceutique) ou d'un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins une microbulle selon l'invention (telle que définie ci-dessus) ; ou une composition(notamment pharmaceutique) telle que définie ci-dessus ; ou d'un kit tel que défini ci-dessus ; ou de toute combinaison de ceux-ci ; pour délivrer un agent à l'intérieur d'au moins une cellule, ou d'un échantillon biologique, de préférence par sonoporation ;

[0227] l'agent étant de préférence choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;

[0228] la cellule étant de préférence choisie parmi une cellule animale, une cellule végétale, une cellule de microorganisme, et toute combinaison de ceux-ci.

[0229] La microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est(sont) de préférence mis(es) en contact avec la cellule ou l'échantillon biologique (notamment administré à l'échantillon) en combinaison avec l'application d'ultrasons, de préférence l'application localisée d'ultrasons, de préférence l'application d'ultrasons localisée sur/vers la zone à traiter et/ou marquer. Les ultrasons sont de préférence appliqués à une fréquence allant de 1kHz à 10MHz, de préférence de 10kHz à 9MHz, de préférence de 50KHz à 8MHz, de préférence de 100kHz à 7MHz, de préférence de

150kHz à 6MHz, de préférence de 200kHz à 5MHz, de préférence de 300kHz à 4MHz, de préférence de 400kHz à 3MHz, de préférence de 500kHz à 2MHz, de préférence de 750kHz à 1,5MHz, de préférence de 0,8MHz à 1,2MHz, de préférence encore à une fréquence d'environ 1MHz.

[0230] Les ultrasons sont de préférence pulsés à une fréquence allant de 1Hz à 10kHz, de préférence de 10Hz à 9kHz, de préférence de 50Hz à 8kHz, de préférence de 100Hz à 7kHz, de préférence de 150Hz à 6kHz, de préférence de 200Hz à 5kHz, de préférence de 300Hz à 4kHz, de préférence de 400Hz à 3kHz, de préférence de 500Hz à 2kHz, de préférence de 750Hz à 1,5kHz, de préférence de 0,8kHz à 1,2kHz, de préférence encore à une fréquence d'environ 1kHz.

[0231] Les ultrasons sont de préférence administrés à une pression acoustique allant de 100 à 800 kPa (pic négatif), de préférence de 200 à 700 kPa, de préférence de 300 à 600 kPa, de préférence de 400 à 500 kPa.

[0232] Les ultrasons sont de préférence administrés pendant 30 à 300 secondes, de préférence pendant 40 à 250 secondes, de préférence pendant 50 à 200 secondes, de préférence pendant 60 à 180 secondes, de préférence pendant 80 à 150 secondes, de préférence pendant 90 à 120 secondes, de préférence pendant 60 secondes.

[0233] Avantageusement, la méthode d'administration de la microbulle, de la composition, du kit, ou de toute combinaison de ceux-ci, comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, les étapes suivantes :

- [0234] a. mise en contact de la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, avec une cellule ou un échantillon biologique ; ou administration de la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, un échantillon biologique, par un mode d'administration approprié (notamment tel que décrit ci-dessus, dans la section « Utilisations et Méthodes thérapeutiques ») ;
- b. Application des ultrasons sur la zone à traiter et/ou marquer (de préférence selon les conditions de fréquences, de pulse, de pression acoustique et de durée décrites ci-dessus).

[0235] La méthode d'administration peut en outre comprendre des étapes additionnelles de préparation de la microbulle, de la composition, du kit, ou de toute combinaison de ceux-ci, préalable à l'étape a) d'administration ; notamment lorsque les microbulles, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, se présente sous une forme lyophilisée ; lesdites étapes additionnelles étant comme suit :

- [0236] i. Optionnellement, mise en suspension du lyophilisat ;
- ii. Optionnellement, activation des microbulles ;
- iii. Optionnellement, mélange des microbulles à un excipient (notamment un diluant) et incubation pendant 0,5 à 15 minutes, de préférence 1 à 10 minutes,

de préférence 1,5 à 8 minutes, de préférence 2 à 6 minutes, de préférence 1 à 5 minutes, de préférence 1 à 3 minutes ;

- iv. Optionnellement mise en présence des microbulles à un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, ou toute combinaison de ceux-ci ; l'agent thérapeutique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, ou toute combinaison de ceux-ci ; pouvant être préalablement mélangé(s) à un excipient (notamment un diluant).

[0237] Selon un mode de réalisation, lorsque la microbulle, la composition, le kit, ou toute combinaison de ceux-ci, est utilisée dans un but de marquage, la méthode comprend en outre une étape de détection de la présence ou non de l'agent de marquage dans la cellule et/ou l'échantillon biologique.

[0238] La microbulle et ses constituants, tels que le lipophosphoramidate, la poly-éthyléimine histidylée, l'agent thérapeutique, l'agent de ciblage, l'agent de marquage, le gaz biocompatible, sont avantageusement tels que décrits dans les sections précédentes (dans la section « Définition », et/ou « Microbulle lipidique », et/ ou « Méthodes de production d'une microbulle lipidique »).

[0239] Avantageusement, la composition et/ou le kit sont tels que décrits ci-dessus dans la section « Compositions et kits ».

[0240] Les exemples qui suivent visent à illustrer la présente invention, et ne sauraient être considérés comme limitatifs.

Description des figures

[0241] [Fig.1] Schéma récapitulatif des formulations développées. La fonctionnalisation de la microbulle peut dépendre de différents constituants, tels que des lipides cationiques (capables d'interactions électrostatiques), et des lipides biotinylés (capable de lier notamment des anticorps par des liaisons streptavidine-biotine).

[0242] [Fig.2] Structure chimique des lipides cationiques (LIPIDE 1) et fusogéniques (LIPIDE 2) utilisés dans les formulations à base de lipophosphoramidates.

[0243] [Fig.3] Distribution en taille des différentes formulations de microbulles développées. L'analyse a été réalisée à l'aide d'analyse d'image de microscopie (logiciel ImageJ®).

[0244] [Fig.4] Mesures du potentiel Zeta (mV) de différentes formulations. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SD de 3 mesures.

[0245] [Fig.5] Gel de complexation (0,6% agarose) de différents volumes de MBc (MB cationique) avec une quantité constante d'ADN plasmidique (1 μ g).

[0246] [Fig.6] Imagerie confocale de microbulles de gaz MBc-tPTX complexant des oligonucléotides CpG couplé à la FITC.

[0247] [Fig.7] Schéma du montage réalisé permettant l'analyse en flux du ciblage des MBs

fonctionnalisées.

- [0248] [Fig.8] A) Graphique représentant la fixation de MB44 sur des cellules hCMEC/D3 stimulées ou non pour la production de récepteur au VEGF. Pistes : point-tiret) MBa sur cellules stimulées ; pointillés) MBa portant le récepteur anti-VEGFR2 sur cellules non stimulées ; trait plein) MBa portant le récepteur anti-VEGFR2 sur cellules stimulées. B) Graphique représentant la fixation de MBc-tPTX sur des cellules stimulées pour la production du récepteur pendant 24h. Pistes : pointillés) MBc-tPTX sans anticorps ; trait plein) MBc-tPTX portant l'anticorps. C) Graphique représentant la fixation de MBc-tPTX complexant des ODN CpG sur des cellules stimulées pour la production du récepteur pendant 48 h. Pistes : pointillés) MBc-tPTX sans anticorps ; trait plein) MBc-tPTX avec anticorps. Barre verticale : fin de l'injection, début des rinçages.
- [0249] [Fig.9] Schéma représentant le dispositif expérimental de sonoporation *in vivo* comprenant une sonde ultrasonore focalisée et un système de positionnement de la motorisé. La souris est placée dans le berceau après injection du Bleu Evan's par voie I.V. l'hémisphère gauche est ensuite ciblé, le traitement FUS est réalisé 10s après injection des MBs pendant 60s. Adapté de Celia Si Ahmed, M2 2018, Orléans.
- [0250] [Fig.10] A) Schéma montrant le partage du cerveau réalisé pour le dosage de l'activité luciférase (bleu : zone traitée par les FUS). B) Photographie du cerveau d'une souris traitée par MBc + FUS à 109 kPa, 24H post-transfection, la tache bleue correspond à l'extravasation du bleu Evan's. C) Photographie d'un cerveau inclus pour la réalisation de coupe au Cryostat®.
- [0251] [Fig.11] Graphique représentant l'activité de la luciférase par mg de protéines dans les différentes zones du cerveau 24 h après sonoporation avec un plasmide pLuc complexé par des MBc. La zone ciblée par l'appareil à ultrasons est la zone 2. Les données représentent la moyenne $\pm$ SEM. **: $p < 0.01$.

Exemples

- [0252] **EXEMPLE : Conception et mises au point de microbulles pour délivrer des actifs de manière ciblée**

1. Introduction

- [0253] Dans le cadre de la présente invention, une nouvelle formulation de microbulles de gaz a été développée. Ces microbulles sont particulièrement avantageuses, puisqu'elles permettent à la fois d'encapsuler différents types d'actifs, tels que des acides nucléiques, et de les délivrer de façon localisée après activation par ultrasons focalisés ([Fig.1]). Un nouveau dispositif a également été développé, permettant d'envoyer des ultrasons dans le cerveau de la souris de façon ciblée. Ce système est couplé à ces microbulles de gaz originales permettant l'encapsulation et la délivrance d'actifs. La for-

mulation de microbulles de gaz est activée puis à l'aide d'un agitateur, l'actif peut être présent dans la formulation ou peut être ajouté après activation de la formulation. Le dispositif se positionne aux coordonnées correspondant au site de délivrance souhaité par l'utilisateur de façon motorisée. Les microbulles originales ici développées sont capables de traverser la BHE. Ainsi, le système de positionnement mis au point peut être implémenté avec un atlas du cerveau permettant de localiser les structures cérébrales à traiter. Les microbulles de gaz sont injectées par voie systémique puis les ultrasons sont envoyés. Le dispositif peut être implémenté d'un système de détection de cavitation passive permettant de contrôler en temps réel l'activation des microbulles par les ultrasons.

[0254] Les formulations de microbulles de gaz permettent d'encapsuler ou de co-encapsuler différents d'actifs :

- [0255] i. des actifs liposolubles, tels que des agents chimio-thérapeutiques (e.g. le paclitaxel), notamment à la surface et/ou dans l'enveloppe de la microbulle;
- ii. des actifs anioniques tels que des acides nucléiques (ADN plasmidiques, petits ARN, ARN messagers, etc. ; e.g. pour la thérapie génique), par exemple à l'aide de lipides cationiques;
- iii. des anticorps, par exemple à l'aide du couple streptavidine-biotine, ou de la chimie-click, ou encore de lipides couplés à groupements methyl tetrazine ;
- iv. des protéines ou des peptides (tels que des peptides pénétrants dans les cellules (CPP)), par exemple à l'aide du couple streptavidine-biotine, ou de la chimie-click, ou encore de lipides couplés à groupements methyl tetrazine.

[0256] Cette grande flexibilité est notamment liée à la formulation originale des microbulles qui consiste en l'utilisation d'un mélange de molécules cationiques telles que des lipophosphoramidates et/ou de la polyéthylimine histidylée.

[0257] En effet, deux types de microbulles cationiques ont été développées ; un à base de lipophosphoramidates l'autre à base de Polyéthylèneimine histidylée couplée à un acide gras.

[0258] Ces microbulles ont déjà montré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* en tant qu'agent théranostique (thérapie et imagerie) ultrasonore. La barrière hémato encéphalique a été perméabilisée de façon transitoire sans danger pour l'animal, ceci a été validé par imagerie IRM et en histologie. Une expression d'un transgène luciférase a été détecté après le protocole de sonoporation.

2. Matériels et méthodes

[0259] *2.1. Production de microbulles (MB) selon l'invention*

[0260] La première étape de la production de MB consiste à mélanger différents lipides en fonction du type de microbulle souhaité. Les lipides KLN27 et MM30 ([Fig.2]) proviennent d'une collaboration avec l'Université de Brest (Berchel). Il s'agit de lipides

phosphoramidate, le LIPIDE1 est de nature cationique tandis que le LIPIDE2 est utilisé comme lipide fusogénique (lipide pouvant fusionner aux membranes, notamment utilisé pour favoriser l'échappement endosomal). Tous les autres lipides utilisés (DMPC, DSPC, DMPE-PEG2000, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000biot) proviennent d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Le mélange des différents lipides est réalisé dans un ballon en présence d'éthanol absolu (99,96% pur). Durant cette étape, le PTX solubilisé dans de l'éthanol absolu (10 mM, Merck, Allemagne) est ajouté selon la formulation (Table 2).

[0261] Table 2 : Liste des formulations utilisées. Les proportions des différents lipides constituant l'enveloppe sont indiquées en pourcentage molaire, par rapport à la quantité totale molaire de lipides.

[0262] [Tableaux2]

			Nature du lipide	Lipide Neutre		Lipide PEGylé			Lipide cationique	Lipide fusiogène	Autre
			Nom	DSPC	DMP C	DSPE-PEG2000	DMPE-PEG2000	DSPE-PEG2000 biot	LIPIDE 1	LIPIDE 2	PTX (µM)
Cationique	Non ciblé	Coût	MBc		22,5%		10%		45%	22,5%	
		PTX	MBc-PTX		22,5%		10%		45%	22,5%	175,66
	Ciblée (t)	Coût	MBc-t		22,5%		9%	1%	45%	22,5%	
		PTX	MBc-t PTX		22,5%		9%	1%	45%	22,5%	175,66
Anionique Ciblée			MBa	90%		9%		1%			

[0263] Par la suite, le mélange est évaporé à l'aide d'un Rotavapor (Büchi, Schwabach,

Allemagne) durant 30 min, 20 rpm à 60°C. Passé cette étape, un film lipidique se forme dans le ballon. Le film lipidique formé est repris dans 2 mL d'HEPES (10 mM, pH 7,4) puis soniqué pendant 5 min afin d'obtenir une solution lipidique homogène ([Fig.10]). La solution est ensuite répartie en volume égal dans 4 flacons à sertir (VWR International, Radnor, PA, USA) qui seront stockés 1 h à -80°C. Enfin, les flacons sont placés au lyophilisateur (Bioblock Scientific, Illkirch, France) pendant une nuit. Une fois le lyophilisat récupéré, les flacons sont sertis manuellement et stockés à 4°C avant d'être activés. L'activation consiste à remplacer l'air du flacon par du perfluorobutane (C₄F₁₀, F2 Chemical, UK) par surpression, puis à réhydrater le lyophilisat avec 500 µl d'une solution d'HEPES 10 mM. Les flacons sont agités 45 s à l'aide d'un VIALMIX (Bristol Myers Squibb, USA). Cette étape permet la formation de microbulles dans le flacon, il est cependant nécessaire d'attendre 5 min post-agitation avant d'effectuer un prélèvement. Une fois un flacon activé, celui-ci peut être gardé quelques jours à 4°C.

[0264] *2.2. Caractérisation des microbulles*

2.2.1. Concentration et taille

[0265] Les microbulles sont observées par un microscope inversé (Nikon Diaphot 300 invert) relié à un ordinateur. Cette installation permet la prise de photographie par une caméra FASTCAM SA7 (Photron, USA) et le logiciel ICcapture®. Les photos sont prises avec différents objectifs (×10, ×20, ×40) puis traitées par ImageJ®. Le traitement consiste en une conversion 8 bit de l'image suivie d'un seuillage permettant la détection des contours des MB. Par la suite, une analyse de particules permet le dénombrement ainsi que l'obtention de la taille. Afin de réaliser cette caractérisation, les microbulles sont diluées au 10^{ème} ou 100^{ème} dans de l'HEPES (10 mM, pH 7,4) puis déposées sur lame de Malassez.

2.2.2. Mesure du potentiel Zêta (ζ)

[0266] Le potentiel ζ correspond à la charge globale d'une particule au niveau de son plan de cisaillement (surface de la particule). Celle-ci est mesurée à l'aide du Nano partica SZ-100 (Horiba, Japon). Afin de réaliser les mesures, 30 µL de MB sont dilués dans 970 µL d'HEPES 10 mM pH 7,4. L'analyse se fait à 25°C.

3. Résultats

[0267] *3.1. Caractérisation des microbulles selon l'invention*

[0268] La taille et la concentration des microbulles préparées selon l'exemple 2 (MB selon la présente invention) sont évaluées par imagerie optique. La [Fig.3] présente les résultats obtenus pour les différentes formulations. Les informations de taille recueillies montrent un diamètre moyen de 1,41 µm pour les MBc et 1,41 µm pour les MBc-PTX, tandis qu'il est de 1,55 µm Pour les MBc-t. Les MBc-tPTX possèdent un diamètre moyen de 1,98 µm. Concernant les microbulles anioniques, les MBa

présentent une taille moyenne de 1,41 μm . Les concentrations des différentes formulations sont réunies dans la Table 3. La distribution en taille et en concentration reste homogène entre les deux grandes catégories de microbulles (cationique et anionique). De manière générale, les MB anioniques (semblables aux MB commerciales) présentent une taille similaire aux MB cationiques, mais une concentration plus élevée. Les MBc fonctionnalisées avec le PTX apparaissent légèrement plus petites et en plus grande concentration que la formulation de base (MBc). Les MBc-tPTX possédant des lipides biotinylés ainsi que du PTX sont celles possédant la plus grande taille ainsi que la plus faible concentration. Cependant, la distribution en taille des MB reste inférieure à 10 μm , permettant leur injection in vivo.

[0269] Table 3 : Tableau récapitulatif des concentrations et tailles moyennes des différentes formulations de microbulles.

[0270] [Tableaux3]

MB	Formulation	Diamètre moyen (μm)	Concentration (MB/mL)
Cationique	MBc	1,41	8,3 x 10⁸
	MBc-PTX	1,41	9,3 x 10⁸
	MBc-t	1,55	1,0 x 10⁹
	MBc-tPTX	1,98	4,25 x 10⁸
Anionique	MBa	1,41	2,38 x 10⁹

[0271] La [Fig.4] présente les mesures de potentiel ζ des formulations développées. Ces résultats ne montrent pas de changement significatif de la charge globale lorsque les MBc sont fonctionnalisées avec le PTX, la biotine, ou les deux en même temps. Celles-ci restent positives (moyenne des MBc : +28,8 mV). La formulation MBa ne possède pas de KLN27 (lipide cationique) et sert donc de contrôle, sa charge est de -23,4 mV.

[0272] 3.2. *Complexation d'acides nucléiques*

[0273] La capacité des microbulles à vectoriser les acides nucléiques est évaluée par gel retard. La [Fig.5] présente la capacité de complexation des microbulles MBc (possédant le lipide cationique KLN27) en présence d'1 μg d'ADN plasmidique (plasmide pLuc). Lorsqu'il n'y a pas de microbulles, une bande migrant à 3 kilobases environ apparaît après révélation aux UV. Cette bande correspond à l'ADN plasmidique non complexé. Plus la concentration en MB est grande, plus l'intensité de la bande à 3 kb diminue, correspondant à une complexation de l'ADNp avec les mi-

crobulles. Lorsque l'ADNp est complexé, celui-ci ne migre plus et reste dans les puits de dépôts. En utilisant 10 μ L de MB la totalité de l'ADNp est complexé, la bande à 3kb n'est plus visible au profit d'un marquage dans les puits.

[0274] Cette capacité de complexation a également été confirmée par microscopie confocale de fluorescence ([Fig.6]). Les MBc-tPTX sont complexées 2 min avec des oligonucléotides CpG couplés à la FITC au ratio 1 μ g d'acide nucléique pour 10 μ L de microbulles. La fluorescence observée sur le contour des microbulles permet de confirmer la complexation des acides nucléiques. Des débris fluorescent sont visibles autour des microbulles montrant probablement la formation de lipoplexes à partir de fragments de microbulles détruites ou de lipides libres en solution.

[0275] *3.3. Evaluation du ciblage des MB fonctionnalisées*

[0276] Afin d'évaluer la capacité de ciblage des MB contre le récepteur au VEGF, une culture en Ibidi® de cellules hCMEC/D3 stimulées pour la production du VEGFR est réalisée, puis une analyse en flux des MB par microscopie optique est faite. Pour ce faire, des plaques de culture en flux 6 canaux (Ibidi® μ -Slide VI0.4, Clinisciences) sontensemencés à raison de 18 000 cellules/canal. Une fois les cellules fixées au fond des canaux, les puits sont remplis de milieu de culture complétés (ou non) de TGF β à 5 ng/ml et les cellules sont mises à incuber 24 h ou 48 h à 37°C sous atmosphère à 5% CO₂. La concentration en TGF β optimal permettant une augmentation du nombre de récepteurs VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales est déterminée par cytométrie en flux.

[0277] Par la suite, la plaque Ibidi® est positionnée sur le microscope inversé doté d'une caméra et relié à l'ordinateur. Le montage utilisé tout au long de l'expérimentation est présenté sur la [Fig.7].

[0278] Afin d'analyser la fixation des microbulles, un champ d'observation est choisi. Différents types de microbulles sont utilisés (décrits dans la Table 2 ci-dessus). À la suite des analyses réalisées en cytométrie en flux, certaines microbulles sont fonctionnalisées avec l'anticorps dirigé contre le récepteur au VEGF (VEGFR2). Pour ce faire, 1,23 μ L de streptavidine (15 mM) sont mis à incuber en présence de 0,3465 μ L d'anticorps anti-VEGFR2-Biot (Anti-mouse CD309, 0,5 mg/mL, eBioscience) afin d'obtenir un ratio de 2,5 moles d'anticorps par mole de streptavidine. Puis, 20 μ L de la solution de MB sont mis à incuber 10 min de manière à fonctionnaliser les MB, en empêchant la formation d'agrégats de microbulles par des liaisons streptavidine-biotine. A la fin des 10 min, une solution d'HEPES 10 mM pH 7,4 est ajoutée afin d'atteindre un volume final de 1 mL.

[0279] La suite de l'expérience consiste en une succession de lavage des cellules en culture. Tout d'abord, un premier lavage de 10min au PBS à lieu, à un débit de 0,137 mL/min (0,25 dyn/cm²). Ensuite, l'injection des MB contenues dans 1 mL est réalisée durant 15

min au même débit, suivie d'un premier rinçage pendant 10 min au PBS, puis d'un deuxième rinçage de 10 min à 0,275 mL/min (0,5 dyn/cm²), pour finir avec troisième rinçage de 10 min à 0,550 mL/min (1 dyn/cm²), suivi d'un dernier rinçage à 1,1 mL/min (2 dyn/cm²). Des photographies du canal sont réalisées toutes les minutes à partir de l'injection. La série de photos est ensuite traitée sur ImageJ® pour obtenir un comptage du nombre de MB par minute.

[0280] La capacité de ciblage des microbulles envers le récepteur au VEGF (VEGFR-2) a été évalué in vitro en temps réel à l'aide d'une chambre de culture permettant la mise en place d'un flux. Les cellules utilisées pour cette analyse sont les cellules endothéliales hCMEC/D3, stimulées ou non par le TGFβ. Différentes formulations ont été testées sur ces cellules afin d'évaluer l'effet de différents constituants sur la capacité de fixation des microbulles ([Fig.8]).

[0281] La figure 8A présente les résultats obtenus pour la formulation anionique MBa. Le volume de MB injecté est le même pour chaque condition testée. Cette formulation est testée sans anticorps sur des cellules stimulées 24 h (point-tiret), avec anticorps sur des cellules non stimulées (pointillés) et avec anticorps sur des cellules stimulées 24 h (trait plein). A t=15min, le 1er rinçage débute. Les résultats montrent un très faible nombre de MB fixées concernant la courbe avec tirets, correspondant aux interactions non spécifiques de ces MB sur les cellules, avec 42 MBa fixées à t=15min. Ce nombre diminue à 27 à la fin des lavages. Concernant la courbe en pointillés, correspondant aux liaisons spécifiques des MB sur les cellules, le nombre de MB fixée est de 112 à t=15min. Ce nombre diminue à 33 à la fin des lavages. La courbe en trait plein, correspondant aux cellules stimulées pour la production du VEGFR2 en présence de MB ciblées, présente un nombre de MB fixées à t=15min de 102. Ce nombre diminue à 52 à la fin des lavages. Cette courbe enregistre donc le plus grand nombre de fixation dans le temps.

[0282] Les figures 8B et 8C présentent les résultats obtenus pour la formulation cationique MBc tPTX (incorporant du PTX et des lipides biotinylés). Cette formulation est testée sur des cellules stimulées à 24 h et 48 h. Les vitesses d'injection et de lavages sont diminuées de moitié par rapport à la figure 8A, afin de ne pas stresser trop rapidement les cellules. Lorsque les microbulles cationiques sont fonctionnalisées avec l'anticorps anti-VEGFR2, celles-ci se lient en plus grand nombre par rapport aux microbulles non fonctionnalisées pour l'anticorps (Figures 8B, 8C). Sans complexation d'acide nucléique, le nombre de MB fixées possédant l'anticorps est environs 110% plus élevée que le nombre de MB fixé sans anticorps. La complexation d'oligonucléotides CpG (Figure 8C) par les microbulles diminue la capacité de liaison au récepteur. Lorsque la microbulle possède l'anticorps et l'acide nucléique, le nombre de MB fixée est environs 60% plus élevé par rapport au contrôle sans anticorps.

[0283] 3.4. *Expérimentation in vivo*

3.4.1. Sonoporation in vivo

[0284] Afin de réaliser de la transfection par MB et FUS, les poils situés sur le crâne de la souris doivent être retirés pour permettre une transmission parfaite des US entre la peau et la sonde ultrasonore. Une fois la souris préparée, celle-ci est anesthésiée à l'aide d'un mélange oxygène/air 1,5% isoflurane (Vetflurane, France) tout au long de l'expérience. Un cathéter équipé d'une aiguille de 26G est placé dans la veine caudale afin de permettre les injections intra veineuses. Une injection de bleu Evan's (5%, solution saline 1 mL/kg) est réalisée. Le bleu Evan's est un colorant se liant à l'albumine circulant et ne passant pas naturellement la BHE, son extravasation est cependant visible après une ouverture via MB+FUS, nous permettant d'obtenir des informations sur la localisation de la zone ciblée par notre protocole une fois le cerveau extrait de la boîte crânienne.

[0285] Ensuite, la souris est placée dans le berceau de la plateforme de sonoporation *in vivo* ([Fig.9]). Les FUS sont appliqués à l'aide d'un transducteur ultrasonore focalisé mono élément de 54 mm de diamètre (Precision Acoustics, UK). Le transducteur est placé dans un cylindre étanche rempli d'eau dégazée et fermé par une membrane. La présence de bulles est à proscrire pour éviter une mauvaise propagation des US. Le transducteur est positionné sur une plateforme de pilotage motorisée reliée à un ordinateur, permettant son déplacement à l'aide du logiciel Repetier. Le ciblage de la zone de transfection se fait visuellement à l'aide d'un pointeur situé au niveau du transducteur. La zone choisie correspond à la moitié de la distance œil-oreille au niveau de l'hémisphère gauche (zone 2). Du gel de conduction ultrasonore est appliqué sur le crâne de la souris afin de permettre la transmission des US. Après pointage, le transducteur se positionne sur la zone pointée et il descend ensuite au contact du gel.

[0286] Par la suite, une solution de 30 µg d'ADNp dilué dans 60 µL d'HEPES 10 mM pH 7,4 et 20 µL sucrose 20% est préparée. Cette solution est mise à incuber 2 min en présence de 120 µL de MBc puis injectée par voie intraveineuse à la souris. Dix secondes après la fin de l'injection, les US sont envoyés pendant 60 s (1 MHz, 5% duty cycle, durée du pulse 1 sec). Deux pressions acoustiques ont été testées : 109 kPa et 145 kPa. Après application des US, les souris sont réveillées.

[0287] 3.4.2. Mesure de l'activité luciférase (dosage RLU)

[0288] 24H après sonoporation, les souris transfectées avec le plasmide codant la luciférase sont euthanasiées et leurs cerveaux sont prélevés. Celui-ci est sectionné en 6 parties, les zones 1, 2, et 3 correspondent à la partie gauche du cerveau et les zones 4, 5, 6 à la partie droite. La zone de transfection ciblée par notre protocole se situe dans la zone 2 visualisée grâce l'extravasation du bleu Evan's ([Fig.10]).

[0289] Chaque partie est ensuite mise dans des tubes Eppendorf® puis plongées dans de

l'azote liquide. Par la suite, les sections sont broyées manuellement dans un mortier en présence d'azote liquide, puis les broyats sont solubilisés dans 500 μ L de tampon de lyse CCLR pendant 1h30. Une centrifugation est réalisée (5 min, 12 000 RPM, 4°C), et 150 μ L de surnageant est récupéré afin d'effectuer une lecture à l'aide du luminomètre Lumat LB9507 (Berthold, Allemagne). L'appareil est ainsi chargé d'une solution de LAR (Luciferase Assay Reagent) permettant la mesure de l'activité luciférase. Le reste du lysat est ensuite utilisé afin de déterminer la concentration en protéine contenue dans chaque zone. Cette quantification est réalisée par un dosage BCA. Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées avec les valeurs d'activité luciférase en RLU/mg de protéines.

- [0290] L'efficacité de la délivrance d'acide nucléique a été testé via la mesure d'activité d'un gène rapporteur codant pour la luciférase. Ce gène a été transfecté dans le cerveau à l'aide de microbulles cationique (MBC) ainsi que par des ultrasons focalisés. Deux pressions acoustiques différentes sont testées, 109 kPa (n=8) et 145 kPa (n=5).
- [0291] Les résultats présentés sur la [Fig.11] montrent une forte activité luciférase (entre $5,5 \times 10^3$ et $1,05 \times 10^4$ RLU/mg protéines) dans les zones 2 et 3 du cerveau des souris, pour les deux puissances ultrasonores utilisées. L'expression de la luciférase est très significativement différente entre les zones 2 et 4 ainsi que pour 2 et 5 pour une puissance de 109 kPa. Les résultats obtenus à 145 kPa ne sont pas significativement différents de ceux obtenus à 109 kPa. L'activité de la luciférase est faible dans les zones 1, 4, 5 et 6 du cerveau (inférieure à 10^3 RLU/mg de protéines). Il est à noter que ces valeurs sont proches de celles du bruit de fond de tissus non transfectés. Le ciblage n'étant pas stéréotaxique et la découpe des zones imprécise, les zones 1 et 3 peuvent présenter de l'activité luciférase. Une forte expression de la luciférase est donc essentiellement mesurée dans l'hémisphère gauche (lieu du ciblage) et non dans l'hémisphère droit, confirmant la possibilité d'utiliser des ultrasons focalisés couplées à des microbulles cationiques afin d'effectuer de la délivrance d'acides nucléiques.

3.4.3. Immunohistochimie

- [0292] Des coupes de cerveaux de souris transfectées avec différents plasmides ont été réalisés afin d'étudier la zone de transfection ainsi que les types cellulaires impliqués. Les zones de transfections sont déterminées par observation de l'extravasation du Bleu Evan's sur la coupe.
- [0293] Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis au point des microbulles innovantes, notamment des microbulles lipidiques innovantes, capables de transporter des drogues, notamment des acides nucléiques, de façon stable dans la circulation sanguine ; de traverser la barrière hémato encéphalique (BHE) ; et de délivrer des drogues de manière ciblées, notamment envers des antigènes d'intérêt.
- [0294] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les microbulles

lipidiques ainsi mises au point possèdent une stabilité significativement améliorée, à la différence des microbulles décrites dans l'art antérieur. De façon remarquable, les données révèlent également que ces microbulles optimisées sont capables de délivrer des agents d'intérêt, notamment des acides nucléiques, de manière plus efficace que les microbulles décrites dans l'art antérieur. Ces microbulles sont notamment capables de traverser les vaisseaux ainsi que la BHE. Les Inventeurs ont également démontré que l'application localisée d'ultrasons permet de cibler ces microbulles optimisées de manière très précise vers la zone à traiter. Ces données révèlent ainsi le potentiel thérapeutique de ces microbulles lipidiques pour traiter de nombreuses pathologies de manière ciblée, y compris des pathologies du système nerveux central.

[0295] Les données montrent également que ces microbulles optimisées sont des outils de détection et d'imagerie.

[0296] La présente invention fournit donc à la fois des méthodes de traitement puissant et à spectre large de pathologies, ainsi que des méthodes de diagnostic efficace et fiable.

[0297] *3.5. Discussion*

[0298] L'ensemble de ces données montre que les microbulles innovantes mises au point par les présentés Inventeurs sont capables de transporter différents types de drogues, notamment des acides nucléiques, de façon stable dans la circulation sanguine ; de traverser la barrière hémato encéphalique (BHE) ; et de délivrer des drogues de manière ciblées, notamment envers des antigènes d'intérêt.

[0299] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les microbulles lipidiques ainsi mises au point possèdent une stabilité significativement améliorée, à la différence des microbulles décrites dans l'art antérieur. De façon remarquable, les données révèlent également que ces microbulles optimisées sont capables de délivrer différents types d'agents d'intérêt, y compris des acides nucléiques, de manière plus efficace que les microbulles décrites dans l'art antérieur. De manière particulièrement intéressante, ces microbulles sont capables de traverser les vaisseaux ainsi que la BHE. Les Inventeurs ont également démontré que l'application localisée d'ultrasons permet de cibler ces microbulles optimisées de manière très précise vers la zone à traiter. Ces données révèlent ainsi le potentiel thérapeutique de ces microbulles lipidiques pour traiter de nombreuses pathologies de manière ciblée, y compris des pathologies du système nerveux central.

[0300] Les données montrent également que ces microbulles optimisées sont des outils de détection et d'imagerie.

[0301] La présente invention fournit donc à la fois des méthodes de traitement puissant et à spectre large de pathologies, ainsi que des méthodes de diagnostic efficace et fiable.

REFERENCES

- [0302] Zhu X, Guo J, He C, Geng H, Yu G, Li J, Zheng H, Ji X, Yan F. Ultrasound triggered image-guided drug delivery to inhibit vascular reconstruction via paclitaxel-loaded microbubbles. *Sci Rep*. 2016 Feb 22;6:21683. doi: 10.1038/srep21683. PMID: 26899550; PMCID: PMC4761943.
- [0303] Fan CH, Ting CY, Liu HL, Huang CY, Hsieh HY, Yen TC, Wei KC, Yeh CK. Anti-angiogenic-targeting drug-loaded microbubbles combined with focused ultrasound for glioma treatment. *Biomaterials*. 2013 Mar;34(8):2142-55. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.048. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23246066.
- [0304] Delalande A, Bastié C, Pigeon L, Manta S, Lebertre M, Mignet N, Midoux P, Pichon C. Cationic gas-filled microbubbles for ultrasound-based nucleic acids delivery. *Biosci Rep*. 2017 Dec 22;37(6):BSR20160619. doi: 10.1042/BSR20160619. PMID: 29180378; PMCID: PMC5741830.
- [0305] Fan CH, Chang EL, Ting CY, Lin YC, Liao EC, Huang CY, Chang YC, Chan HL, Wei KC, Yeh CK. Folate-conjugated gene-carrying microbubbles with focused ultrasound for concurrent blood-brain barrier opening and local gene delivery. *Biomaterials*. 2016 Nov;106:46-57. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.017. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27544926.

Revendications

- [Revendication 1] Microbulle lipidique, comprenant au moins un composé cationique choisi parmi les lipophosphoramidates, les polyéthylénimines histidylées, et tout mélange de ceux-ci.
- [Revendication 2] Microbulle selon la revendication 1, comprenant en outre au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ; ledit au moins un agent étant de préférence :
- i. exposé à la surface de la microbulle, ou
 - ii. enchâssé dans l'enveloppe lipidique de la microbulle, ou
 - iii. incorporé à l'intérieur de la microbulle, ou
 - iv. toute combinaison de i à iii.
- [Revendication 3] Microbulle selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit au moins un agent est choisi parmi :
1. un acide nucléique ;
 2. un actif liposoluble ;
 3. un agent chimio-thérapeutique, tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique ;
 4. un anticorps ;
 5. une protéine ;
 6. un antigène ;
 7. une toxine ;
 8. un récepteur
 9. une enzyme ;
 10. une hormone ;
 11. un ligand ;
 12. Un vecteur viral ;
 13. une nanoparticule, comprenant de préférence au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
 14. tout dérivé de 1) à 13), de préférence tout dérivé fonctionnel de ceux-ci ;
 15. tout fragment de 1) à 14), de préférence tout fragment fonctionnel de ceux-ci ; et

16. toute combinaison de 1) à 15).

[Revendication 4] Microbulle selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre au moins un groupement fonctionnel permettant la liaison à au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ; ledit groupement étant de préférence :

- i. exposé à la surface de la microbulle, ou
- ii. enchâssé dans l'enveloppe lipidique de la microbulle, ou
- iii. incorporé à l'intérieur de la microbulle, ou
- iv. toute combinaison de i à iii.

[Revendication 5] Microbulle selon la revendication 4, le groupement fonctionnel étant choisi parmi :

- un peptide étiquette ;
- un groupement chimique, de préférence choisi parmi une fonction cliquable, un groupement de couplage, et toute combinaison de ceux-ci ;
- un anticorps ;
- un dérivé d'anticorps ;
- un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé ;
- une étiquette d'affinité ; et
- toute combinaison de ceux-ci.

[Revendication 6] Microbulle selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le lipophosphoramidate est choisi dans le groupe constitué par un dimyristoyl phosphoramidate, choisi de préférence parmi un dimyristoyl bromure phosphoramidate, un dimyristoyl histamine phosphoramidate, et toute combinaison de ceux-ci ; un dioleyle phosphoramidate, choisi de préférence parmi un dioleyle méthylimidazolium phosphoramidate, et toute combinaison de ceux-ci ; et tout mélange de ceux-ci.

[Revendication 7] Microbulle selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la polyéthyléimine histidylée est couplée à un acide

gras, l'acide gras étant de préférence choisi parmi l'acide stéarique, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide oléique, et toute combinaison de ceux-ci.

[Revendication 8] Microbulle selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre un lipide additionnel choisi dans le groupe constitué par une dimyristoyl-glycéro-phosphocholine, une distéaroyl-glycéro-phosphocholine, une dimyristoyl-glycéro-phosphoéthanolamine-polyéthylène glycol, une distéaroyl-glycéro-phosphoéthanolamine-polyéthylène glycol, et une distéaroyl-glycéro-phosphoéthanolamine-[biotinyl(polyéthylène glycol)], un cholestérol, un beta-sitostérol, un 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), un 1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-3-trimethylammonium propane (DOTAP), un 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (DMG-PEG2000), et toute combinaison de ceux-ci.

[Revendication 9] Microbulle selon l'une quelconque des revendications précédentes, contenant un gaz biocompatible, le gaz étant de préférence choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), un oxyde d'azote (NO), l'hydrogène, le dioxygène, l'hélium, le xénon, l'argon, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci.

[Revendication 10] Composition pharmaceutique comprenant au moins une microbulle selon l'une quelconque des revendications précédentes, et, optionnellement, un excipient pharmaceutiquement acceptable, la concentration en microbulles dans la composition allant de préférence de 10⁶ à 10¹⁴ microbulles/ml, de préférence encore de 10⁷ à 10¹³ microbulles/ml, de préférence encore de 10⁸ à 10¹² microbulles/ml, de préférence encore de 10⁹ à 10¹¹ microbulles/ml, de préférence encore la concentration en microbulles dans la composition étant d'environ 10¹⁰ microbulles/ml.

[Revendication 11] Kit, comprenant :

- a) au moins une microbulle selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans un premier récipient ;
- b) au moins un agent thérapeutique, dans un second récipient ;
- c) optionnellement, au moins un agent de ciblage dans un troisième récipient ;
- d) optionnellement, au moins un agent de marquage dans un quatrième

réceptient ;

e) optionnellement, des instructions de préparation et/ou d'utilisation ;
l'agent thérapeutique et/ou l'agent de ciblage et/ou l'agent de marquage
étant de préférence choisi(s) parmi :

1. un acide nucléique ;
2. un actif liposoluble ;
3. un agent chimio-thérapeutique, tel qu'un agent cytotoxique et/ou un agent cytostatique ;
4. un anticorps ;
5. une protéine ;
6. un antigène ;
7. une toxine ;
8. un récepteur
9. une enzyme ;
10. une hormone ;
11. un ligand ;
12. Un vecteur viral ;
13. une nanoparticule, comprenant de préférence au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
14. tout dérivé de 1) à 13), de préférence tout dérivé fonctionnel de ceux-ci ;
15. tout fragment de 1) à 14), de préférence tout fragment fonctionnel de ceux-ci ; et
16. toute combinaison de 1) à 15) ;

de préférence encore parmi un acide nucléique, un actif liposoluble, un agent chimio-thérapeutique, un anticorps, un dérivé d'anticorps, un fragment fonctionnel d'anticorps ou de son dérivé, une protéine, un fragment de protéine, une nanoparticule, et toute combinaison de ceux-ci.

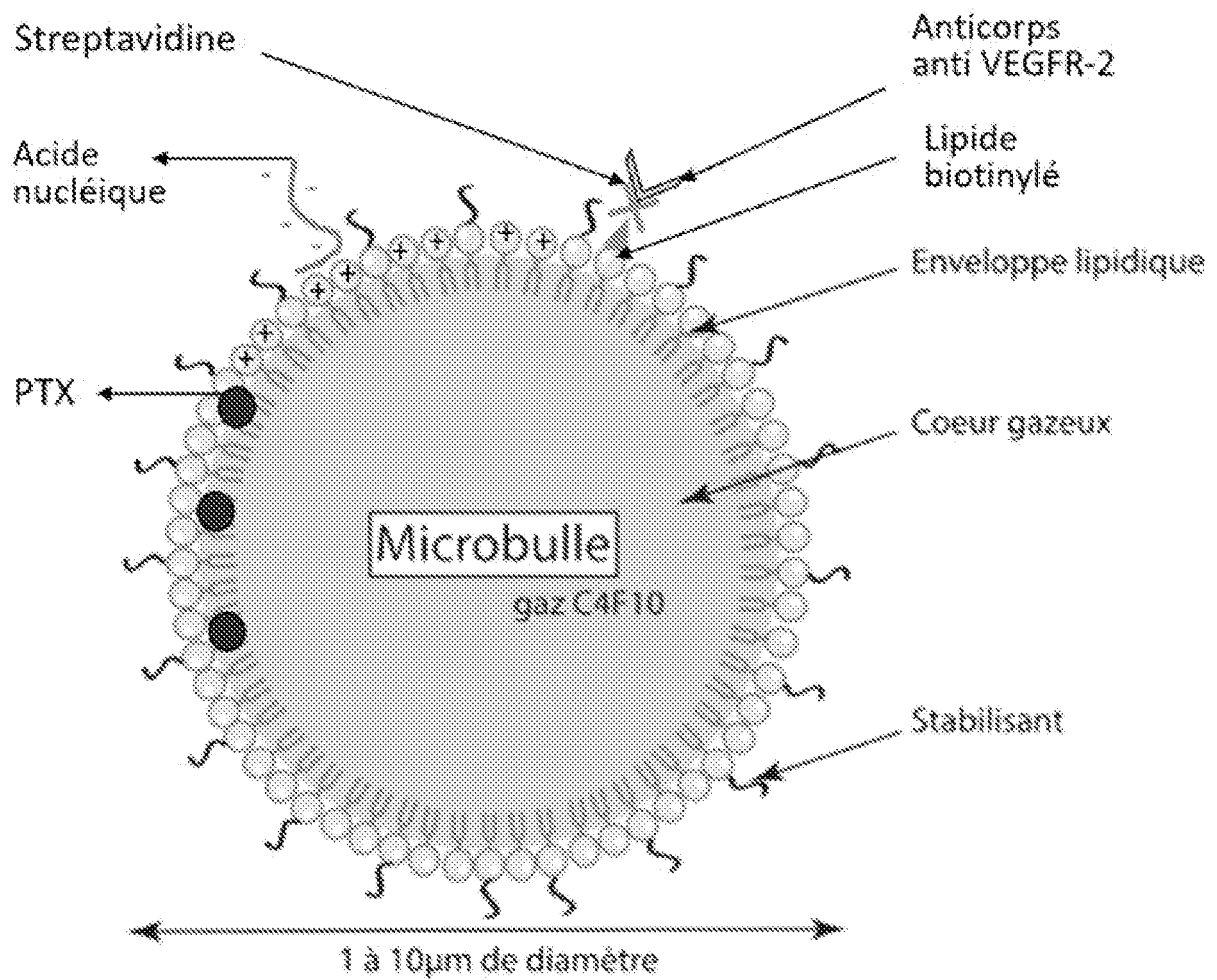
[Revendication 12] Microbulle selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, composition pharmaceutique selon la revendication 10, ou kit selon la revendication 11, pour son utilisation comme médicament ou comme agent de marquage.

[Revendication 13] Méthode de production d'au moins une microbulle selon l'une

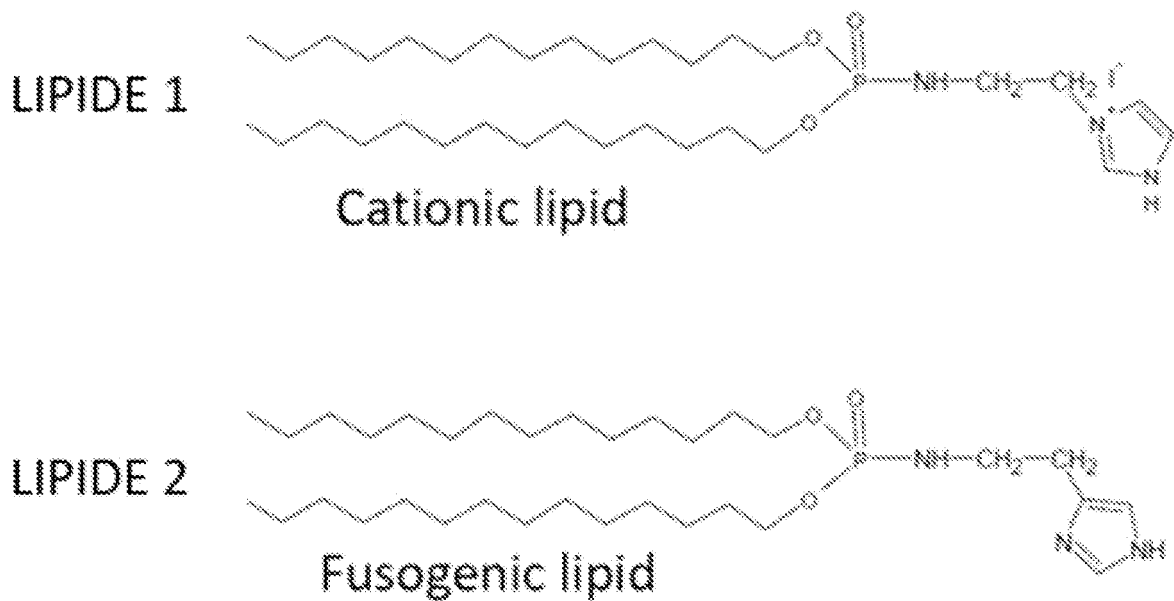
quelconque des revendications 1 à 9, comprenant les étapes suivantes :

- a. Mélange, dans un récipient, de composés cationiques choisis parmi les lipophosphoramidates, les polyéthyléimines histidylées, et les mélanges quelconques de ceux-ci ; d'éthanol; et optionnellement d'au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ;
- b. Evaporation du mélange obtenu à l'étape a) pour obtenir un film lipidique et réhydratation du film lipidique pour former une suspension liposomale;
- c. Lyophilisation de la suspension liposomale obtenue à l'étape b) ;
- d. Remplacement de l'air contenu dans le récipient contenant le lyophilisat obtenu à l'étape c), par un gaz biocompatible, le gaz étant de préférence choisi parmi un perfluorobutane (C₄F₁₀), un perfluoropropane (C₃F₈), le diazote (N₂), un hexafluorure de soufre (SF₆), un oxyde d'azote (NO), l'hydrogène, le dioxygène, l'hélium, le xénon, l'argon, le protoxyde d'azote (N₂O), et tout mélange de ceux-ci ;
- e. Réhydratation du lyophilisat de l'étape d) pour obtenir une solution;
- f. Agitation de la solution obtenue à l'étape d) pour former des microbulles ;
- g. Optionnellement, fonctionnalisation des microbulles par au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci ; et/ou fonctionnalisation des microbulles par l'ajout au moins un groupement fonctionnel permettant la liaison à au moins un agent choisi parmi un agent thérapeutique, un agent de ciblage, un agent de marquage, et toute combinaison de ceux-ci.

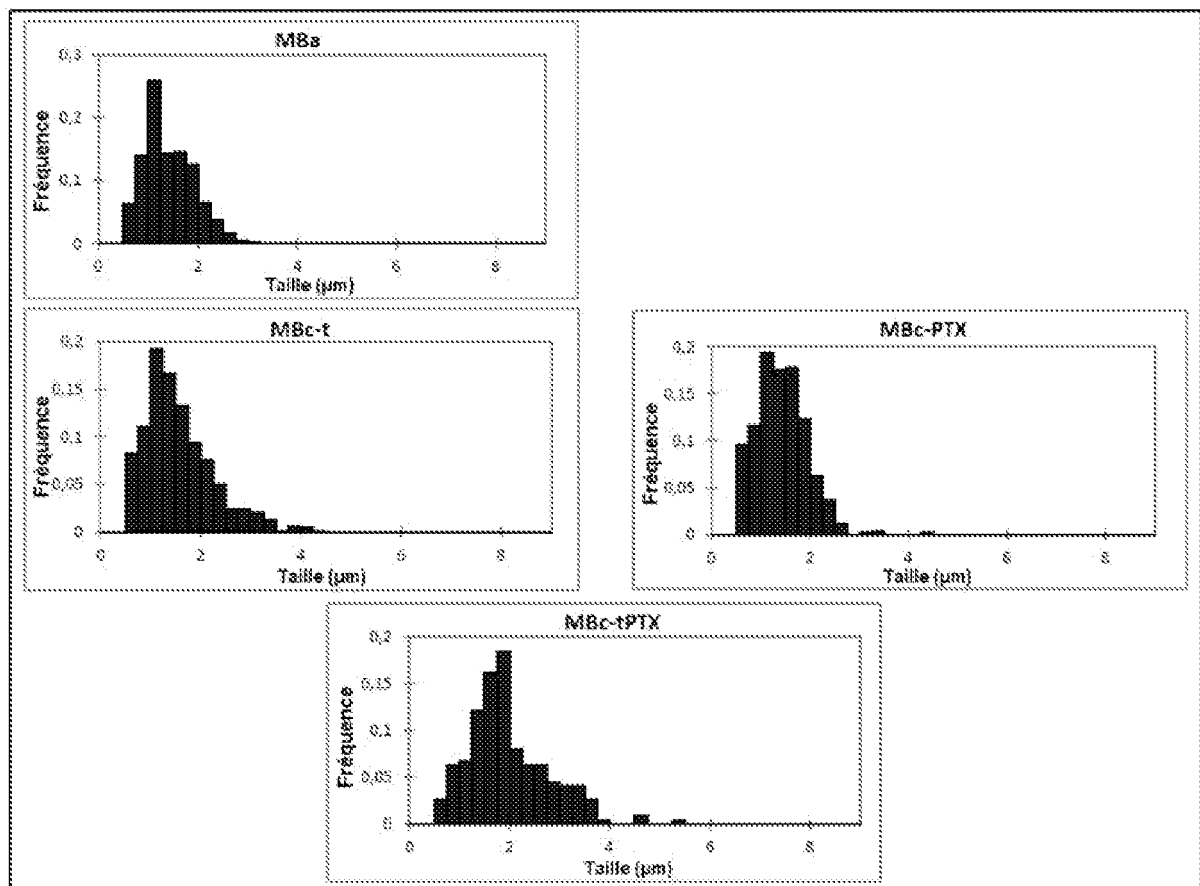
[Fig. 1]



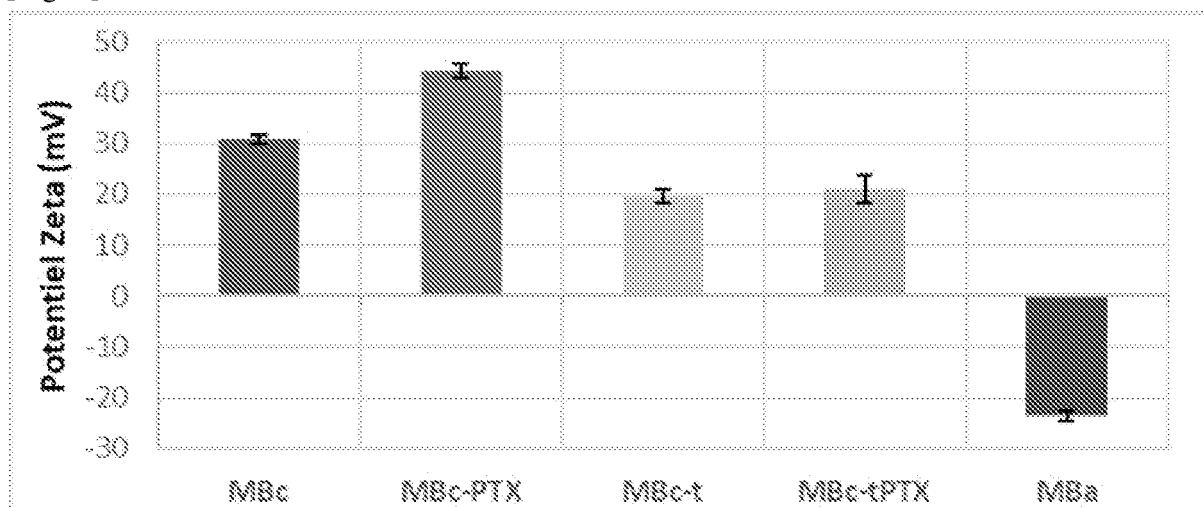
[Fig. 2]



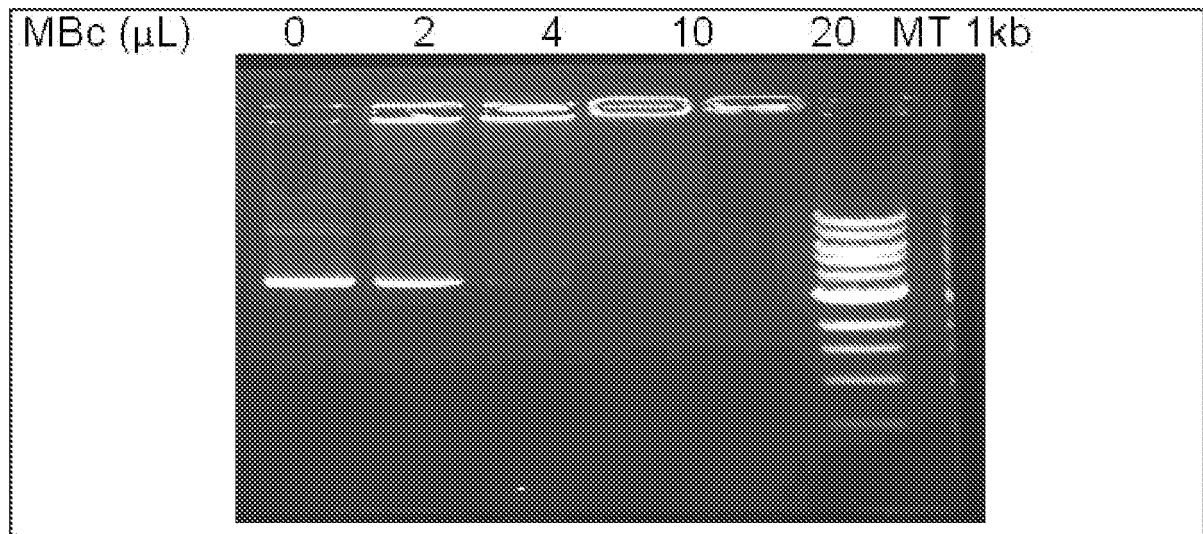
[Fig. 3]



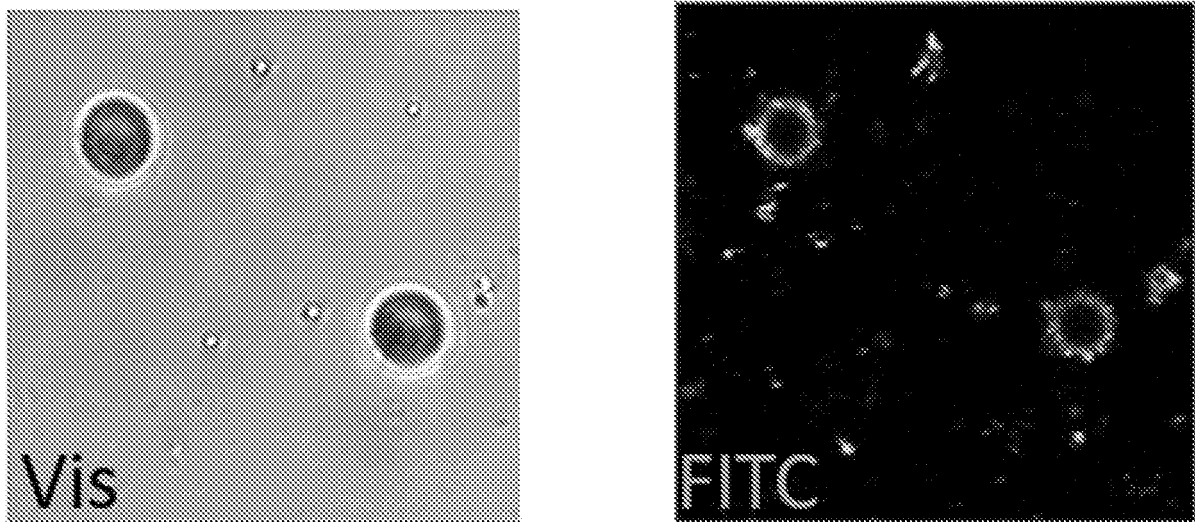
[Fig. 4]



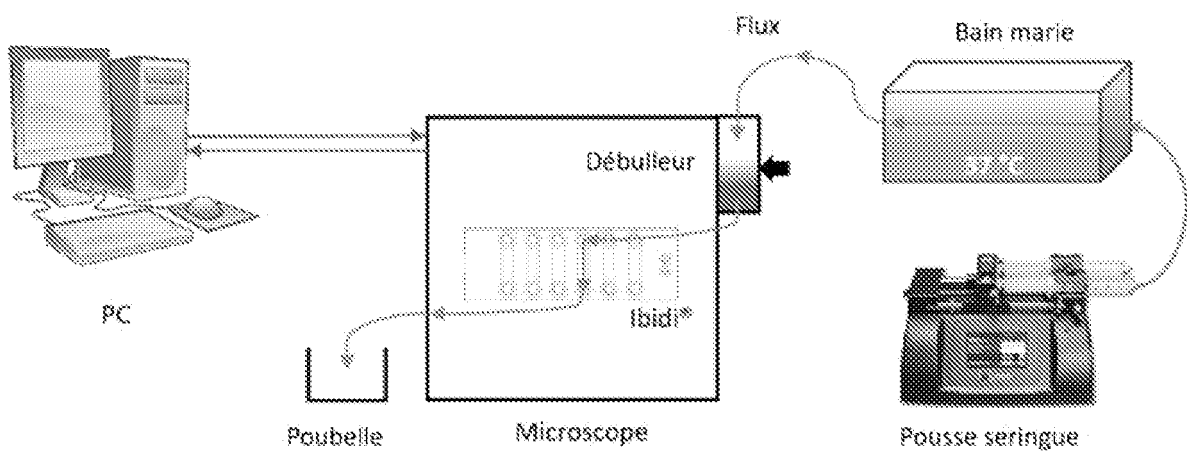
[Fig. 5]



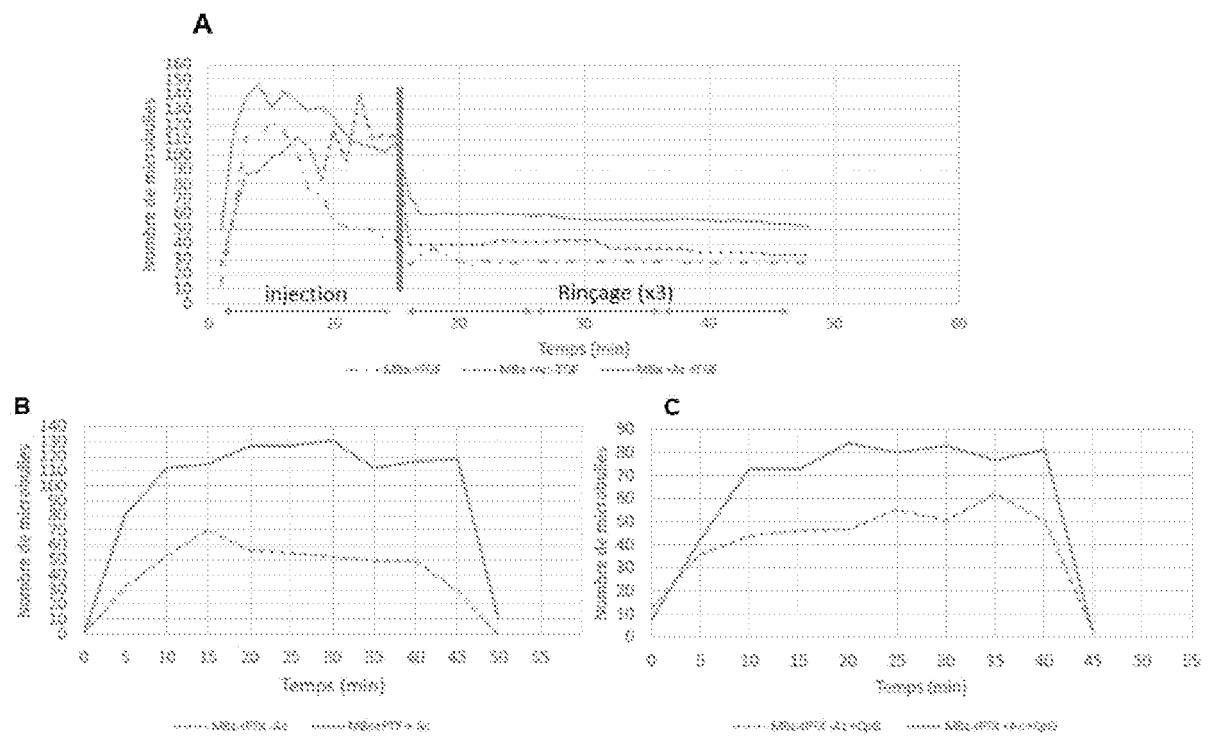
[Fig. 6]



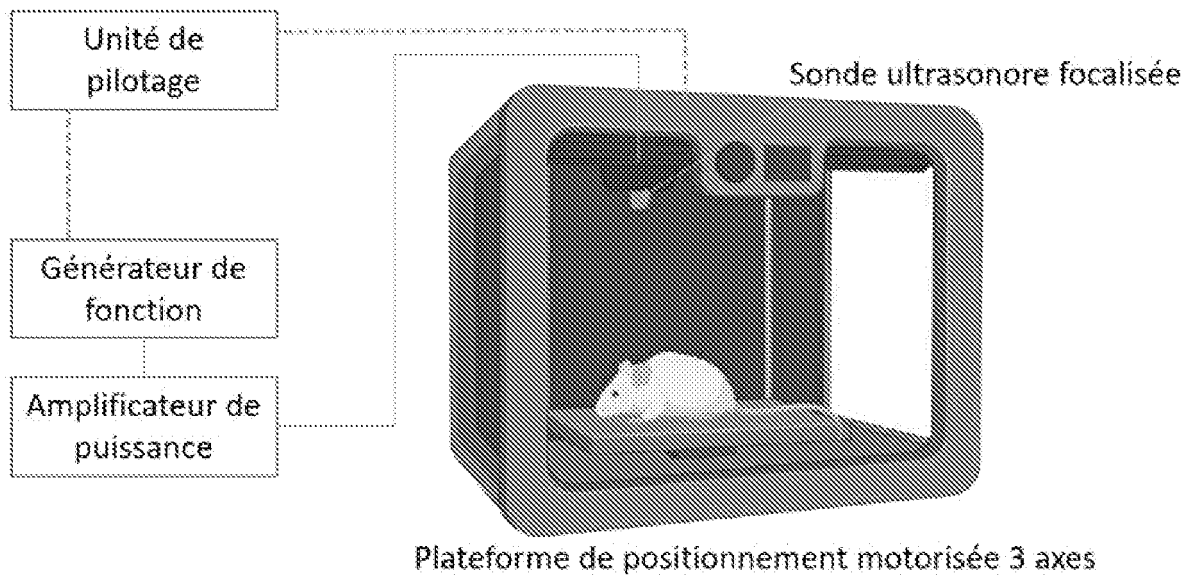
[Fig. 7]



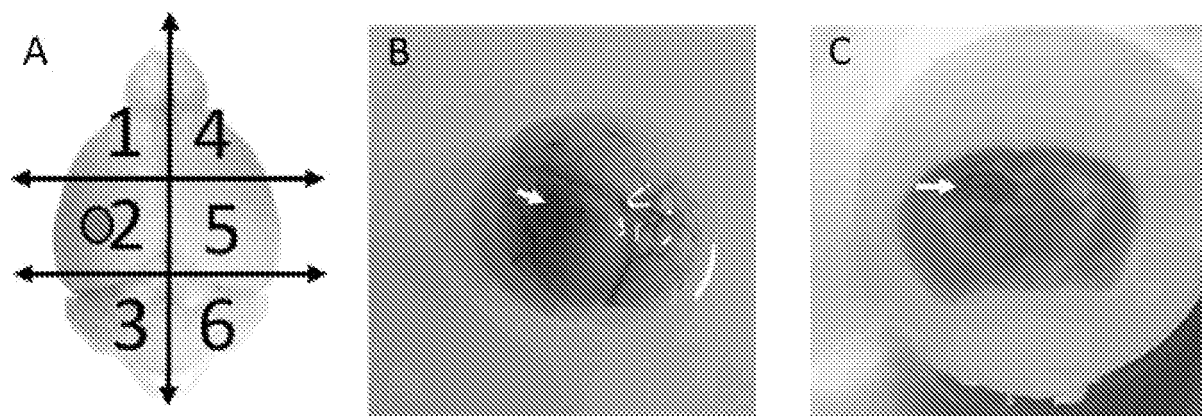
[Fig. 8]



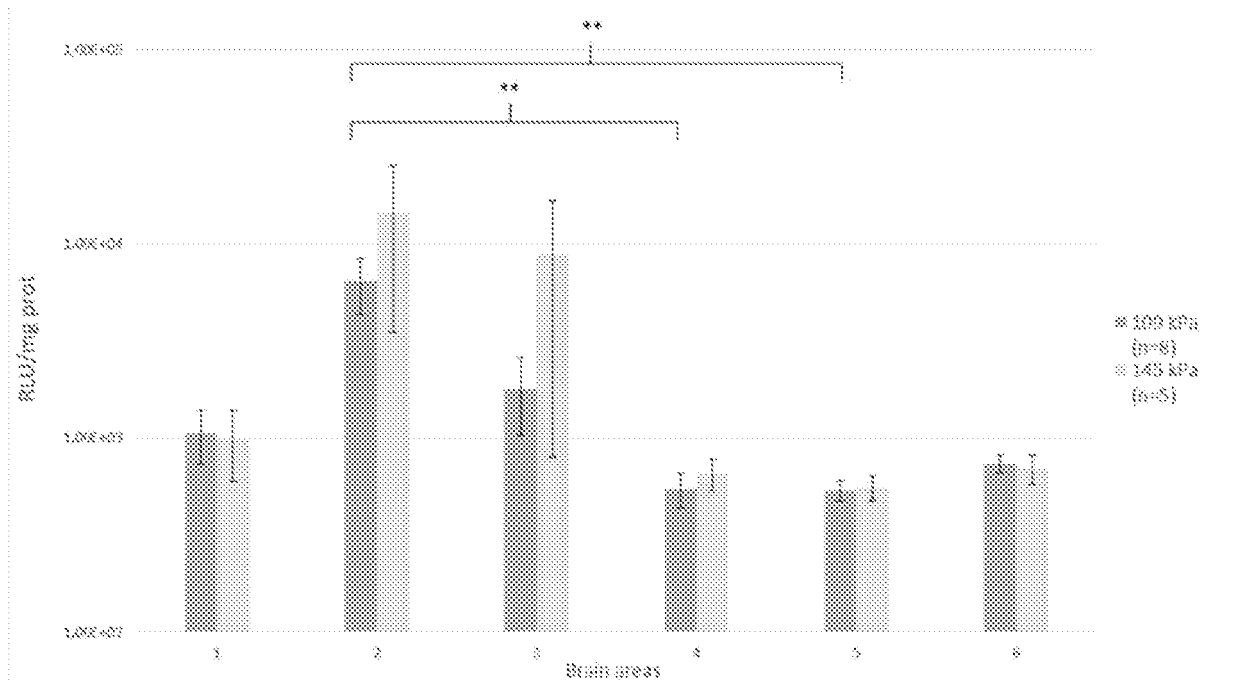
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 906946

FR 2205492

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y, D	DELALANDE ANTHONY ET AL: "Cationic gas-filled microbubbles for ultrasound-based nucleic acids delivery", CELL DEATH AND DISEASE, vol. 37, no. 6, 22 décembre 2017 (2017-12-22), XP055779309, ISSN: 0144-8463, DOI: 10.1042/BSR20160619 Extrait de l'Internet: URL: http://portlandpress.com/bioscirep/article-pdf/doi/10.1042/BSR20160619/808204/bsr-2016-0619c.pdf> * page 7, alinéa 3-5 * * page 9; tableau 9 * -----	1-13	A61K9/10 A61K47/44
Y	CHANG EN-LING ET AL: "Angiogenesis-targeting microbubbles combined with ultrasound-mediated gene therapy in brain tumors", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 255, 11 avril 2017 (2017-04-11), pages 164-175, XP085032958, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2017.04.010 * page 165, section 2.2.1 * * page 174, section 5 * ----- -/--	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61P C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 janvier 2023		Villard, Anne-Laure	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 906946
FR 2205492

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	JIN QIAOFENG ET AL: "A Novel Cationic Microbubble Coated with Stearic Acid-Modified Polyethylenimine to Enhance DNA Loading and Gene Delivery by Ultrasound", PLOS ONE, vol. 8, no. 9, 26 septembre 2013 (2013-09-26), page e76544, XP093015427, DOI: 10.1371/journal.pone.0076544 Extrait de l'Internet: URL:https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0076544&type=printable> * abrégé * * page 2, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 3 * * figure 1 * * page 9, "Conclusions" * -----	1-13	
Y	GONÇALVES CRISTINE ET AL: "Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER, NL, vol. 460, no. 1, 10 novembre 2013 (2013-11-10), pages 264-272, XP028548421, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2013.11.005 * abrégé * * page 265, "Materials" * * pages 265-266, sections 2.1 et 2.4 * * page 267, scheme 1 * * page 270, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, ligne 4 * ----- -/--	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 janvier 2023		Villard, Anne-Laure	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 906946
FR 2205492

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	PATRICK MIDOUX ET AL: "Lipid-based mRNA vaccine delivery systems", EXPERT REVIEW OF VACCINES, vol. 14, no. 2, 12 février 2015 (2015-02-12), pages 221-234, XP055439935, GB ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1586/14760584.2015.986104 * pages 223-227, "Lipid-based formulations" * * tableaux 1,2 * * figure 3 * -----	1-6,8-13	
A	FR 2 928 373 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 11 septembre 2009 (2009-09-11) * page 4, lignes 7-17 * * revendications * -----	1-13	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 janvier 2023		Villard, Anne-Laure	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

FR 2205492 FA 906946

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **19-01-2023**

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

FR 2928373	A1	11-09-2009	CA	2717778	A1	17-09-2009
			DK	2257587	T3	26-08-2019
			EP	2257587	A1	08-12-2010
			ES	2744827	T3	26-02-2020
			FR	2928373	A1	11-09-2009
			IL	207975	A	31-12-2014
			PL	2257587	T3	31-01-2020
			US	2011091407	A1	21-04-2011
			WO	2009112402	A1	17-09-2009