

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
24 octobre 2024 (24.10.2024)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2024/218311 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/17 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)  
A61K 9/00 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 27/02 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2024/060741

(22) Date de dépôt international :

19 avril 2024 (19.04.2024)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

FR2304056 21 avril 2023 (21.04.2023) FR

(71) Déposants : PULSESIGHT THERAPEUTICS [FR/FR]

; 11 rue Watt - BIOPARK BÂT B, 75013 Paris (FR).  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE-  
CHERCHE MEDICALE [FR/FR] ; 101 rue de Tolbiac,  
75013 PARIS (FR). SORBONNE UNIVERSITE [FR/FR] ;  
21 rue de l'école de médecine, 75006 PARIS (FR). UNI-  
VERSITE PARIS CITE [FR/FR] ; 85 BOULEVARD  
SAINT GERMAIN, 75006 PARIS (FR). ASSISTANCE  
PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS [FR/FR] ; 55 Bou-  
levard Diderot, CS 22305, 75610 PARIS CEDEX 12 (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))  
— avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(72) Inventeurs : BORDET, Thierry ; 36 rue Boussingault,

75013 PARIS (FR). BIGOT, Karine ; 8 route des Vallées,  
41360 Lunay (FR). BENICHO, Laura ; 10 rue Rémusat,  
75016 PARIS (FR). BEHAR-COHEN, Francine ; 160 rue  
de Longchamp, 75116 PARIS (FR).

(74) Mandataire : CABINET NONY ; 11 rue Saint-Georges,

75009 PARIS (FR).

(54) Title: DECORIN-BASED COMPOSITIONS FOR REPAIR AND REGENERATION OF RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

(54) Titre : COMPOSITIONS À BASE DE DÉCORINE POUR LA RÉPARATION ET LA RÉGÉNÉRATION DE L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE DE LA RÉTINE

(57) Abstract: The present invention primarily relates to a protein, in this case decorin, or a fragment thereof, for use in the treatment of an eye disease in a person in need thereof (i) the eye disease being characterised by a tear in or partial or total loss of the retinal pigment epithelium (RPE) in the person; and (ii) the protein comprising a protein sequence that comprises at least 85% sequence identity with the sequence SEQ ID NO: 1 or with the sequence SEQ ID NO: 2. The invention also relates to the implementation, for the same purpose, of a nucleic acid sequence encoding such a protein, and to the use of this protein, or a fragment thereof, or of the nucleic acid sequence to repair or regenerate a retinal pigment epithelium (RPE) in a person in need thereof.

(57) Abrégé : La présente invention concerne à titre principal une protéine, en l'occurrence la décorine, ou un fragment de celle-ci, pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez ledit individu; et (ii) la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2. Est également concernée la mise en oeuvre dans ce même but d'une séquence d'acides nucléiques codant pour une telle protéine, de même que la mise en oeuvre de cette protéine, ou un fragment de celle-ci, ou de cette séquence d'acides nucléiques pour la réparation ou la régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en ayant besoin.



WO 2024/218311 A1

**Description****Titre :****COMPOSITIONS À BASE DE DÉCORINE POUR LA RÉPARATION ET LA RÉGÉNÉRATION DE L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE DE LA RÉTINE****5 Domaine technique**

La présente invention concerne le domaine de l'ophtalmologie et en particulier la mise en œuvre de la Décorine dans le traitement de pathologies oculaires caractérisées par une déchirure ou par une perte de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La Décorine est plus particulièrement décrite pour sa capacité à réparer et à restaurer l'EPR et en particulier la

10 barrière que forme l'EPR, chez des individus dont l'intégrité de l'EPR a été atteinte. La présente invention concerne également la mise en œuvre de la Décorine pour améliorer la reconstruction rétinienne après transplantation d'un EPR et ainsi augmenter la prise de greffes de rétine ainsi que la survie des greffons et la qualité de la vision post-opératoire des patients ainsi traités.

15

**Technique antérieure**

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est une structure monocellulaire formée d'une seule couche de cellules hexagonales régulières et quiescentes, située dans la couche la plus externe de la rétine. La face externe de l'EPR est reliée à la membrane de Bruch et à la choroïde, tandis

20 que la face interne est reliée au segment externe des cellules photoréceptrices.

Les cellules de l'EPR jouent un rôle majeur dans le maintien de la fonction visuelle et dans le cycle visuel. En effet, les cellules de l'EPR présentent des microvillosités au pôle apical qui s'étendent entre les segments externes des photorécepteurs (POS), ce qui leur permet de phagocyter et d'éliminer les POS exfoliés pour maintenir le renouvellement normal des cellules

25 visuelles. De plus, le gène *RPE65* (*retinal pigment epithelium-specific 65*) code une rétinoïde isomérolase exprimée dans les cellules de l'EPR et est indispensable au cycle de la transduction du signal visuel en régénérant le 11-cis rétinol après exposition lumineuse. L'EPR contient aussi une quantité importante de mélanine, ce qui lui donne une coloration brun foncé. Cette mélanine réduit les dommages causés par la lumière ultraviolette à la rétine. L'EPR permet

30 aussi de réduire l'accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les dommages oxydatifs qui en résultent. Les cellules de l'EPR forment des jonctions serrées intercellulaires constituées de ZO-1, ocludine et de claudines, agissant comme une barrière entre les capillaires choroïdiens fenestrés et la couche photosensible de la rétine. De plus, les cellules de l'EPR jouent un rôle clé dans le transport des nutriments, de l'eau et des électrolytes

entre la choroïde et les cellules rétinienne. En résumé, la structure et la fonction de l'EPR sont essentielles à une vision normale, et les altérations ou la perte de l'EPR altèrent la fonction visuelle et peuvent conduire à la perte de la vision.

Diverses affections oculaires peuvent entraîner une perte des cellules de l'EPR. Par exemple, l'atrophie géographique est une forme de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) caractérisée par l'atrophie et la disparition des cellules de l'EPR dans la macula entraînant la mort des cellules photoréceptrices sus-jacentes et la cécité. L'atrophie géographique est une cause majeure de cécité chez les personnes âgées de plus de 60 ans. Il est estimé que l'atrophie géographique affecte environ 5 millions de personnes dans le monde, et que sa prévalence augmente de manière exponentielle avec l'âge (Wong, et al., *Lancet Glob Health*, 2:e106-116, 2014 ; Rudnicka, et al., *Am J Ophthalmol*, 160:85-93, 2015). De plus, la majorité des patients atteint de DMLA humide évolue vers une atrophie géographique (Rofagha, et al., *Ophthalmology*, 120:2292–2299, 2013). La choroïdémie mais aussi les dystrophies maculaires, telles que la maladie de Stargardt, la dégénérescence vitelliforme juvénile de la macula ou maladie de Best, la dégénérescence maculaire de Sorsby, la dégénérescence maculaire en aile de papillon, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord, ou la dystrophie aréolaire centrale, sont d'autres exemples d'affections oculaires dans lesquelles la disparition de l'EPR est observée. La maladie de Stargardt, en particulier, est la forme la plus commune de dégénérescence maculaire juvénile héréditaire, avec une prévalence de 1 cas pour 10 000 naissances. Il n'y a pour l'instant pas de traitement pour ces pathologies.

Par ailleurs, diverses affections oculaires provoquent des déchirures dans l'épithélium pigmentaire rétinien. L'une des causes bien connues d'une déchirure de l'EPR est un décollement pigmentaire rétinien vascularisé (DPR) chez les patients atteints de DMLA exsudative. Bien que des déchirures de l'EPR puissent se développer spontanément dans des DPR vascularisés, la plupart des cas récents ont été associés à des injections d'inhibiteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (anti-VEGF). Le liquide sous-rétinien dans le DPR exerce une pression hydrostatique sur l'EPR et l'étire. Le DPR s'agrandit à mesure que la pression hydrostatique augmente. La contraction de la membrane néovasculaire choroïdienne ajoute des forces de traction à la monocouche d'EPR. En particulier dans les DPR plus importants, il est connu que le risque de déchirure de l'EPR augmente après une thérapie anti-VEGF en raison de l'augmentation de la contraction de la membrane néovasculaire choroïdienne (Mehmet Giray Ersoz *et al.* ; *Surv Ophthalmol*. 2017 Jul-Aug;62(4):493-505 ; M

Sastre-Ibáñez et al. ; J Fr Ophtalmol. 2019 Jan;42(1):63-72; Christoph R Clemens and Nicole Eter; Ophthalmologica. 2016;235(1):1-9).

Les déchirures de l'EPR peuvent compliquer divers troubles associés au DPR, notamment la chorioretinopathie séreuse centrale, la toxémie de la grossesse, la néphropathie à  
5 immunoglobuline A (IgA) et la maladie de dépôt de chaînes légères.

Parmi d'autres causes de déchirures de l'EPR peuvent également être cités le syndrome présumé d'histoplasmose oculaire, la vitréoretinopathie proliférative avec décollement de la rétine rhématogène primaire, le trou maculaire, la traction vitréomaculaire, la chirurgie de sclérotomie pour décollement de la rétine rhématogène, l'hypertension artérielle pulmonaire familiale, la  
10 chorioretinopathie traumatique, les tumeurs choroïdiennes, la chirurgie du glaucome, la maladie de Vogt-Koyanagi-Harada, la nécrose rétinienne aiguë, la panuvéite, la sclérite, le syndrome du bébé secoué, la forte myopie, les lésions induites par des lasers ou par l'exposition excessive à des lumières (artificielles, solaire, éclipses).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode éprouvée permettant de prévenir des déchirures  
15 de l'EPR.

Il n'existe ainsi à l'heure actuelle que peu de propositions de traitements visant non pas à prévenir la dégradation de l'EPR mais véritablement à permettre sa régénération, sa réparation, en particulier dans le cas de déchirures de l'EPR voire même dans le cas de pathologies ayant conduit à une disparition partielle ou totale de celui-ci. Pour les pathologies  
20 de la rétine plus avancées, des approches de greffe, qui consiste en la transplantation de cellules de l'EPR ou de cellules photoréceptrices, sont actuellement en développement (Aghaizu et al Prog. Brain Res., 231 (2017), pp. 191-223; Foik et al., J. Neurosci., 38 (2018), pp. 10709-10724; Santos-Ferreira et al., Front Syst. Neurosci., 10 (2016), p. 105). Des transplantations peuvent être réalisées sur des patients présentant des degrés différents de  
25 dégénérescence rétinienne à l'aide de matériaux provenant de donneurs ou de cellules souches pluripotentes, et consister soit en des suspensions de cellules de l'EPR, soit en des feuillets rétiniens. Les stratégies à base de suspension cellulaire consistent à transplanter des cellules précurseurs de photorécepteurs purifiées (Bartsch et al., Exp. Eye Res., 86 (2008), pp. 691-700; MacLaren et al., Nature, 444 (2006), pp. 203-207; Pearson et al., Nature, 485 (2012), pp.  
30 99-103), tandis que les transplantations de feuillets rétiniens permettent de greffer des organoïdes rétiniens contenant à la fois des cellules photoréceptrices et des neurones rétiniens internes (Assawachananont *et al.*, Stem Cell Rep., 2 (2014), pp. 662-674; Radtke et al., Am. J. Ophthalmol., 146 (2008), pp. 172-182). Les deux méthodes ont montré une intégration

cellulaire, une maturation des cellules photoréceptrices et une certaine récupération de la réponse à la lumière (Barnea-Cramer *et al.*, Sci. Rep., 6 (2016), p. 29784; Iraha *et al.*, Sci. Rep., 6 (2016), p. 29784).

5 Cependant, ces méthodes sont complexes et comportent comme toute greffe des risques de rejet, ceux-ci étant d'autant plus élevés lorsque la reconstitution rétinienne après transplantation s'avère insuffisante, réduisant les chances de prise de la greffe ainsi que la survie des greffons, ce qui joue un rôle déterminant quant à la qualité de la vision post-opératoire chez le patient.

10 Les pathologies de la rétine représentent ainsi un enjeu majeur de santé publique en raison de leur forte prévalence et de leur impact social et économique.

Il existe par conséquent un besoin important de disposer d'une nouvelle solution permettant la réparation et/ou la régénération de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), en particulier dans des pathologies caractérisées par une déchirure ou par une absence/disparition de l'EPR.

15 Il existe également un besoin de disposer d'une nouvelle solution permettant de restaurer l'EPR et en particulier la barrière que forme l'EPR, chez des individus dont l'intégrité de l'EPR a été atteinte.

Il existe par ailleurs également un besoin pour améliorer la reconstruction rétinienne après transplantation d'un EPR.

20 Il existe également un besoin d'augmenter la prise de greffes de rétine ainsi que la survie des greffons.

Il existe de plus un besoin d'améliorer la qualité de la vision post-opératoire des patients ayant bénéficié d'une greffe de rétine telle que décrite précédemment.

25 La présente invention telle que décrite ci-dessous vise à répondre ces besoins.

### **Résumé de l'invention**

Un premier objet de la présente invention concerne donc une protéine, ou un fragment de celle-ci, pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin :

- 30 (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez ledit individu ; et  
(ii) la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

En effet, et contre toute attente, comme démontré *in vivo* dans deux modèles différents d'animaux dans les exemples, la décorine s'avère être capable de réparer et de régénérer l'EPR chez des individus en ayant besoin.

Par conséquent, une protéine, ou un fragment de celle-ci, selon l'invention permet

5 avantageusement, et contre toute attente :

- de réparer les déchirures, ouvertures et/ou interruption de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) ;

- de régénérer un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) lorsque celui-ci a disparu partiellement ou totalement ;

10 - et ainsi de restaurer l'EPR et en particulier la barrière que forme l'EPR, chez des individus dont l'intégrité de l'EPR a été atteinte.

Ainsi, une pathologie oculaire traitée par une protéine mise en œuvre selon l'invention peut être choisie dans le groupe constitué d'une déchirure de l'épithélium pigmentaire de la rétine ; d'une atrophie géographique ; d'une choroidémie ; et d'une dystrophie maculaire

15 héréditaire, en particulier choisie parmi la maladie de Stargardt, la dégénérescence vitelliforme juvénile de la macula ou maladie de Best, la dystrophie aréolaire centrale, la dégénérescence maculaire de Sorsby, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord, et la dégénérescence maculaire en aile de papillon.

La présente invention a également pour objet une protéine, ou un fragment de celle-ci, pour la  
20 réparation ou la régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en ayant besoin, la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

Une protéine mise en œuvre selon l'invention peut en outre comprendre un peptide signal, en particulier un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence  
25 SEQ ID NO : 6.

La présente invention a également pour objet une protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation dans la reconstruction d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu recevant ou ayant reçu une greffe d'EPR, la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la  
30 séquence SEQ ID NO : 2.

Une protéine, ou un fragment de celle-ci, mise en œuvre selon l'invention peut être administrée à l'individu en ayant besoin par application topique sur l'œil, par exemple par l'intermédiaire de gouttes pour les yeux ; par injection intravitréenne ; par injection sous-

conjonctivale ; par injection supra-choroïdienne ; par injection sous-rétinienne ; et/ou à l'aide d'un implant intravitréen.

La présente invention a également pour objet une séquence d'acides nucléiques pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin :

- 5 (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) ; et
- (ii) la séquence d'acides nucléiques codant pour une protéine, ou un fragment de celle-ci, telle que précédemment décrite, i.e. une protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence
- 10 SEQ ID NO : 2, et optionnellement en outre un peptide signal, notamment un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6.

Ladite pathologie oculaire peut être choisie dans le groupe constitué d'une déchirure de l'épithélium pigmentaire de la rétine ; d'une atrophie géographique ; d'une choroïdérémie ; et d'une dystrophie maculaire héréditaire, en particulier choisie parmi la maladie de Stargardt, la

15 dégénérescence vitelliforme juvénile de la macula ou maladie de Best, la dystrophie aréolaire centrale, la dégénérescence maculaire de Sorsby, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord, et la dégénérescence maculaire en aile de papillon.

La présente invention a également pour objet une séquence d'acide nucléique pour la réparation ou la régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en

20 ayant besoin, la séquence d'acides nucléiques codant pour une protéine, ou un fragment de celle-ci, telle que précédemment décrite, i.e. une protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, et optionnellement en outre un peptide signal, en particulier un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6.

25 Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut comprendre une séquence ayant au moins 70% d'identité de séquence avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5.

Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut en outre comprendre

30 une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal, en particulier une séquence nucléotidique ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 7.

Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut être comprise dans un vecteur, le vecteur pouvant en particulier être un vecteur viral, un vecteur non viral, un plasmide, un lipide, un liposome ou une nanoparticule.

Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut se présenter sous la forme d'une construction d'ADN destinée au transfert non viral d'acides nucléiques dans les cellules musculaires de la sphère oculaire de l'individu en ayant besoin, ladite construction d'ADN étant caractérisée en ce qu'elle comprend:

(a) optionnellement une origine de répllication bactérienne ou procaryotique,

(b) une ou plusieurs séquences favorisant l'expression de l'ADN dans la sphère oculaire du patient,

(c) une séquence nucléotidique codant:

- pour une protéine thérapeutique comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celle-ci, et

- optionnellement pour un peptide signal permettant la sécrétion de cette première protéine thérapeutique, en particulier pour un peptide signal de séquence ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6 ;

ce peptide signal, lorsqu'il est présent, étant contiguë de la séquence de la protéine thérapeutique, en N-terminal de ladite première protéine thérapeutique,

(d) un promoteur permettant l'expression de cette protéine thérapeutique dans la sphère oculaire du patient ; et

(e) optionnellement une séquence de polyadénylation en 3' de la séquence nucléotidique.

Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut être administrée à l'individu en ayant besoin par injection dans un muscle ciliaire, optionnellement suivie d'une étape d'électrotransfert dans les cellules du muscle ciliaire.

### **Brève description des dessins**

[Fig 1] représente, en Figure 1A, les scores moyens (ordonnée) (entre 0 et 1 : grade 0 : pas de couverture de la lésion par l'EPR ou couverture avec des cellules anormales (pas

hexagonales) ; grade 0.5 : couverture partielle de la lésion avec des cellules EPR hexagonales ; grade 1 : couverture complète de la lésion avec des cellules EPR hexagonales) de réparation d'une lésion avec des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dans un groupe de rats modèle de néovascularisation choroïdienne contrôle (traités avec PBS – gauche) ou dans un

groupe de rats modèle de néovascularisation choroïdienne traités avec de la décorine (DCN - droite). La Figure 1B représente la répartition des scores de 1, 0,5 ou 0 (de haut en bas pour chaque barre) dans chaque groupe de rats (gauche contrôle – PBS ; droite traitement décorine – DCN). L'axe des ordonnées représente le % d'impact en fonction du score de ces deux groupes de rats.

[Fig 2] représente le pourcentage de lésions de grade 3 (score angiographique) obtenue après visualisation de la vascularisation rétinienne et choroïdienne à 14 jours (J14 - gauche) et à 28 jours (J28 – droite) chez des rats modèle de néovascularisation choroïdienne persistante induite en l'absence de traitement (contrôle).

[Fig 3] représente le pourcentage relatif de lésions de grade 3 (score angiographique) obtenue après visualisation de la vascularisation rétinienne et choroïdienne à 14 jours (J14 - gauche) et à 28 jours (J28 – droite) et comparé entre 4 groupes de rats modèles de néovascularisation choroïdienne persistante induite: de gauche à droite : groupe contrôle administré par injection d'une solution contrôle de tampon salin suivi d'une étape d'électrotransfert (Ctrl -

Electroporation) ; groupe administré par injection de la construction dite plasmide A suivi d'une étape d'électrotransfert (Plasmide A - Electroporation) ; groupe contrôle administré par injection intravitréenne d'une solution contrôle de tampon phosphate (Ctrl – Injection IVT) ; groupe contrôle administré par injection intravitréenne d'Aflibercept (15µg) (Aflibercept – Injection IVT).

[Fig 4] représente, en Figure 4A, l'évaluation de la surface d'immunomarquage positive au marqueur RPE65 (indiquant la présence de cellules de l'EPR) rapportée à la taille totale de la lésion NVC comparée entre 4 groupes de rats modèles de néovascularisation choroïdienne persistante induite : de gauche à droite : groupe contrôle administré par injection d'une solution contrôle de tampon salin suivi d'une étape d'électrotransfert (Ctrl - Electroporation) ;

groupe administré par injection de la construction dite plasmide A suivi d'une étape d'électrotransfert (Plasmide A - Electroporation) ; groupe contrôle administré par injection intravitréenne d'une solution contrôle de tampon phosphate (Ctrl – Injection IVT) ; groupe contrôle administré par injection intravitréenne d'Aflibercept (15µg) (Aflibercept – Injection IVT). En Figure 4B, pour ces mêmes 4 groupes représentés dans le même ordre de gauche à

droite, est représentée la répartition de la couverture de la rétine par des cellules de l'EPR, en pourcentage. De haut en bas pour chaque colonne est représentée l'incidence des lésions en fonction du pourcentage de couverture de l'EPR (entre 80-100%, 60-80% ou 0-60% de couverture de la lésion NVC pour l'EPR).

[Fig 5] représente une construction d'ADN comprenant une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention (Plasmide A).

### Description détaillée

#### 5 Définitions

Dans le contexte du présent texte, les termes « traiter » et « traitement » désignent une diminution, voire une interruption de la pathologie ou du trouble considéré(e).

Le terme « patient » ou « individu » tel qu'utilisé dans le présent texte désigne de préférence un mammifère, y compris un mammifère non-humain, et plus particulièrement un être humain.

- 10 En particulier, il s'agit d'un patient ou d'un individu souffrant d'une pathologie oculaire, en particulier d'une pathologie oculaire caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien, plus particulièrement souffrant d'une pathologie oculaire choisie dans le groupe constitué d'une déchirure de l'épithélium pigmentaire de la rétine, d'une atrophie géographique, d'une choroidérémie ; et d'une dystrophie maculaire
- 15 héréditaire, en particulier choisie parmi la maladie de Stargardt, la dégénérescence vitelliforme juvénile de la macula ou maladie de Best, la dystrophie aréolaire centrale, la dégénérescence maculaire de Sorsby, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord, et la dégénérescence maculaire en aile de papillon.

- Pour chacune des séquences d'acides aminés ou d'acides nucléiques d'intérêt, des séquences de
- 20 référence sont décrites ici. La présente description englobe également des séquences d'acides aminés ou nucléiques ayant des pourcentages spécifiques d'identité d'acides aminés ou de nucléotides avec une séquence de référence.

- Pour des raisons évidentes, dans toute la présente description, une séquence spécifique d'acides nucléiques ou une séquence spécifique d'acides aminés qui respecte, respectivement, l'identité
- 25 de nucléotide ou d'acide aminé considérée, doit en outre conduire à l'obtention d'une protéine qui présente l'activité biologique recherchée. Tel qu'utilisé ici, le "pourcentage d'identité" entre deux séquences d'acides nucléiques ou entre deux séquences d'acides aminés est déterminé en comparant les deux séquences alignées de manière optimale à travers une fenêtre de comparaison.

- 30 La partie de la séquence de nucléotides ou d'acides aminés dans la fenêtre de comparaison peut donc comprendre des ajouts ou des suppressions (par exemple des "trous") par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces ajouts ou ces suppressions) afin d'obtenir un alignement optimal entre les deux séquences.

Les termes "homologie de séquence" ou "identité de séquence" ou "homologie" ou "identité" sont utilisés indifféremment dans le présent document. Aux fins de l'invention, on entend par là que pour déterminer le pourcentage d'homologie de séquence ou d'identité de séquence de deux séquences d'acides aminés ou de deux séquences d'acides nucléiques, les séquences sont alignées à des fins de comparaison optimale. Afin d'optimiser l'alignement entre les deux séquences, des lacunes peuvent être introduites dans n'importe laquelle des deux séquences comparées. Cet alignement peut être effectué sur toute la longueur des séquences comparées. L'alignement peut également être effectué sur une longueur plus courte, par exemple sur une vingtaine, une cinquantaine, une centaine ou plus d'acides nucléiques/bases ou d'acides aminés.

5 L'identité de séquence est le pourcentage de correspondances identiques entre les deux séquences sur la région alignée déclarée.

La comparaison des séquences et la détermination du pourcentage d'identité de séquence entre deux séquences peuvent être effectuées à l'aide d'un algorithme mathématique. L'homme du métier sait que plusieurs programmes informatiques différents sont disponibles pour aligner deux séquences et déterminer l'identité entre deux séquences (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules : the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley).

15

Le pourcentage d'identité de séquence entre deux séquences d'acides aminés ou entre deux séquences de nucléotides peut être déterminé à l'aide de l'algorithme de Needleman et Wunsch pour l'alignement de deux séquences. (Needleman, S. B. et Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). L'algorithme permet d'aligner à la fois des séquences d'acides aminés et des séquences de nucléotides. L'algorithme Needleman-Wunsch a été mis en œuvre dans le programme informatique NEEDLE.

20

Pour les besoins de l'invention, le programme NEEDLE du progiciel EMBOSS a été utilisé (version 2.8.0 ou supérieure, EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden J. et Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276- 277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Pour les séquences de protéines, EBLOSUM62 est utilisé pour la matrice de substitution. Pour les séquences de nucléotides, EDNAFULL est utilisé. Les paramètres facultatifs utilisés sont une pénalité d'ouverture d'espace de 10 et une pénalité d'extension d'espace de 0,5. Aucune pénalité d'écart de fin n'est ajoutée. Dans la section Output, Yes a été indiqué en réponse à la question "Brief identity and similarity" et "SRS pairwise" a été indiqué comme format d'alignement de sortie.

25

30

Après l'alignement par le programme NEEDLE décrit ci-dessus, le pourcentage d'identité de séquence entre une séquence d'interrogation et une séquence de l'invention est calculé comme suit : Nombre de positions correspondantes dans l'alignement montrant un acide aminé identique ou un nucléotide identique dans les deux séquences divisé par la longueur totale de l'alignement après soustraction du nombre total de lacunes dans l'alignement. L'identité définie ici peut être obtenue à partir de NEEDLE en utilisant l'option NOBRIEF et est étiquetée dans la sortie du programme comme "identité la plus longue".

La similarité des séquences de nucléotides et d'acides aminés, c'est-à-dire le pourcentage d'identité des séquences, peut être déterminée par des alignements de séquences à l'aide de plusieurs autres algorithmes connus, de préférence avec l'algorithme mathématique de Karlin et Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5873-5877), avec hmmalign (HMMER package, <http://hmm.wustl.edu/>) ou avec l'algorithme CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible par exemple sur <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> ou le programme GAP (algorithme mathématique de l'Université de l'Iowa) ou l'algorithme mathématique de Myers et Miller (1989 - Cabios 4 : 11-17) ou Clone Manager 9. Les paramètres préférés utilisés sont les paramètres par défaut tels qu'ils sont définis sur <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Le degré d'identité des séquences (concordance des séquences) peut être calculé à l'aide, par exemple, de BLAST, BLAT ou BlastZ (ou BlastX). Un algorithme similaire est incorporé dans les programmes BLASTN et BLASTP d'Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Les recherches polynucléotidiques BLAST sont effectuées avec le programme BLASTN, score = 100, longueur de mot = 12, afin d'obtenir des séquences polynucléotidiques homologues aux acides nucléiques qui codent la protéine concernée.

Les recherches BLAST sur les protéines sont effectuées avec le programme BLASTP, score = 50, longueur de mot = 3, pour obtenir des séquences d'acides aminés homologues au polypeptide SHC. Pour obtenir des alignements gappés à des fins de comparaison, Gapped BLAST est utilisé comme décrit dans Altschul et al (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Lors de l'utilisation des programmes BLAST et Gapped BLAST, les paramètres par défaut des programmes respectifs sont utilisés. L'analyse de la correspondance des séquences peut être complétée par des techniques établies de cartographie homologique telles que Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1 : 154-162) ou les champs aléatoires de Markov. Lorsqu'il est fait référence à des pourcentages d'identité de séquence dans la présente demande,

ces pourcentages sont calculés par rapport à la longueur totale de la séquence la plus longue, sauf indication contraire.

Dans des modes de réalisation particuliers, le pourcentage d'identité entre deux séquences est déterminé à l'aide de CLUSTAL O (version 1.2.4).

5

#### Peptide décorine

La décorine est une glycoprotéine sécrétée de la famille des protéoglycanes à répétition riche en leucine (SLRP). Les membres de la famille SLRP sont caractérisés par des régions riches en cystéine en N- et C terminal qui encadrent une région centrale contenant 10 à 12

10

répétitions en tandem riches en leucine (Schaefer, L. and R.V. Iozzo, *J. Biol. Chem.*

283:21305, 2008). L'ADN complémentaire de la décorine humaine code pour un précurseur de 359 acides aminés (AA) qui comprend une séquence signal de 16 AA et un propeptide de 14 AA qui est clivé pendant la maturation de la protéine (Krusius, T. and E. Ruoslahti, *Proc.*

*Natl. Acad. Sci.*, 83:7683, 1986 ; Danielson, et al., *Genomics*, 15: 146-160, 1993). La décorine

15

humaine mature contient douze répétitions en tandem riches en leucine et partage 80% et 78% d'identité de séquence d'AA avec la décorine de souris et de rat, respectivement. L'épissage

alternatif de la décorine humaine génère cinq isoformes avec des délétions de longueur

variable. La décorine est une protéine glycosylée en N-terminale qui porte également une chaîne hybride chondroïtine/dermatane sulfate de taille variable au niveau de Ser34

20

(Scholzen, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 269:28270, 1994; Zamfir, A. et al., *Glycobiology*, 13:733, 2003). Le protéoglycane naturel de la décorine a une masse moléculaire d'environ 100 kDa, et la protéine centrale déglycosylée de la décorine a une masse d'environ 40 kDa (Roughley, P.J and R.J. White, *Biochem. J.*, 262:823, 1989).

25

La décorine est une protéine de la matrice extracellulaire (MEC) et interagit avec des protéines de la MEC, notamment le collagène de type I et II, la fibronectine, et la thrombospondine, et contribue à leur organisation et à leur stabilité (Scott, JE, *Biochemistry*,

35 : 8795, 1996 ; Scott, JE, et al., *Exp. Cell Res.*, 243 : 59-66, 1998). La décorine, en

particulier, joue un rôle critique dans le contrôle de la croissance et dans l'organisation des

30

fibres de collagène de la cornée pour la rendre transparente (Rada, JA, *Exp Eye Res*, 56 ; 635,

1993). En conséquence, l'utilisation de la décorine pour stabiliser le stroma cornéen a été

suggérée dans l'art antérieur en complément de l'orthokératologie pour la correction de la myopie, de l'hypermétrie, de l'astigmatisme et de la presbytie (par exemple,

US2009/0105127). L'utilisation de la décorine pour stabiliser et organiser les fibres de collagène de la MEC dans les tissus rétinien, en particulier la membrane de Bruch, a aussi été suggérée dans l'art antérieur pour le traitement de la DMLA ou de la rétinopathie diabétique (par exemple, WO2011/069046). Dans ce brevet, les inventeurs ont découvert que la décorine  
5 peut être administrée dans le fond de l'œil pour empêcher, retarder ou limiter la progression de la désorganisation de la matrice extracellulaire de la membrane de Bruch.

La décorine régule aussi l'activité biologique des facteurs de croissance associés à la matrice extracellulaire, notamment le *fibroblast growth factor 2* (FGF2), la Myostatine, et  
10 *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ) (Järveläinen, et al., *Matrix Biol*, 43, 15–26, 2015). Elle se lie également aux récepteurs tyrosine kinase membranaires, notamment le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*), le récepteur de l'IGF1 (*insulin-like growth factor-1*) et le récepteur du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), et régule leur activité. *In vivo*, la décorine favorise l'inhibition ou l'induction de l'angiogenèse (Grant, et.al., *Oncogene*, 21/  
15 4765-4777, 2002 ; Sulochana, et.al., *J. Biol. Chem.* 280:27935-27948, 2005). En effet, selon le microenvironnement, la décorine peut exercer des effets pro ou anti-angiogéniques. En conséquence, l'utilisation de la décorine pour inhiber l'angiogenèse a été suggérée dans l'art antérieur pour le traitement de la DMLA exsudative (par exemple, WO2005116066 et WO2011069046). En particulier, WO2011069046 a suggéré que l'injection intravitréenne de  
20 décorine pourrait convenir au traitement de la DMLA. L'injection intravitréenne de décorine réduit en effet la néovascularisation choroïdienne induite par photocoagulation au laser de la choroïde chez le rongeur (Wang, et al, *Scientific Reports*, 7:9672, 2017 ; Zhao, et al. *Nature Communications*,10:369, 2019). En particulier, la décorine est utilisée pour son activité inhibitrice du TGF $\beta$ , une protéine bien connue pour activer l'angiogenèse et le remodelage  
25 vasculaire en modulant la prolifération des cellules endothéliales, l'infiltration des macrophages, ainsi que le dépôt et le remodelage protéolytique de la MEC. Ainsi, l'utilisation de la décorine a été suggérée dans l'art antérieur pour le traitement des formes de néovascularisations choroïdiennes résistantes au traitement anti-VEGF (par exemple, WO2019229116).

30 La décorine est également décrite pour son activité inhibitrice de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). En particulier, la décorine inhibe la TEM des cellules de l'EPR induite par TGF $\beta$ 2 *in vitro* et réduit la synthèse de collagène, suggérant que la décorine pourrait empêcher ou ralentir la formation de fibrose sous-rétinienne qui survient dans la DMLA (Begum, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59:4929–4936 2018). La décorine permet

aussi de réduire la progression de la fibrose dans un modèle de vitréorétinopathie proliférative traumatique chez le lapin (Nassar, et al., Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 249 :1649, 2011). L'injection intravitréenne de la protéine recombinante décorine permet aussi de réduire la fibrose du réseau trabéculaire dans le canal de Schlemm chez le lapin, suggérant que la décorine pourrait réduire la pression intraoculaire pour le traitement du glaucome (Hill, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 56:3743-57, 2015).

La décorine est décrite aussi pour ses propriétés de cytoprotection, notamment vis-à-vis des cellules de l'EPR soumises à un stress oxydatif (Xie, et al., Oxidative Medicine and Cellular Longevity, ID 3955748, 2022). La décorine prévient aussi la rupture de la barrière de l'EPR induite par un apport élevé en glucose et une hypoxie en supprimant l'activation de la MAPK p38, suggérant que la décorine pourrait inhiber le développement des œdèmes maculaires diabétiques (Wang, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 56:2971–2979, 2015).

Il n'avait toutefois jamais été démontré ou même suggéré que la décorine puisse être capable de réparer et de régénérer un EPR. La décorine selon l'invention comprend une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

Par au moins 85% d'identité de séquences, on entend désigner une séquence d'acides aminés comprenant au moins 85 %, au moins 86 %, au moins 87 %, au moins 88%, au moins 89%, au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99% ou 100% d'identité de séquence avec la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID NO : 2.

La demande couvre également la mise en œuvre d'un fragment d'une protéine mise en œuvre selon l'invention, à savoir de la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

Par « fragment », on entend un « fragment fonctionnel », c'est-à-dire une séquence protéique ou une séquence d'acides nucléiques qui, une fois exprimée, présente la même activité qu'une protéine de SEQ ID NO : 1 ou qu'une protéine de SEQ ID NO : 2. En particulier, on entend une séquence protéique ou une séquence d'acides nucléiques qui, une fois exprimée, présente la même activité que la décorine, notamment tel que démontré dans les exemples ci-après et comme mentionné ci-dessus.

Dans la présente demande, sauf indication contraire, lorsque le terme protéine est employé, on

entend de manière indifférente désigner une protéine ou un fragment de protéine.

Dans certains cas, des fragments fonctionnels de protéines selon l'invention peuvent notamment être obtenus par digestion protéolytique de protéines natives, notamment de décorine, par des techniques bien connues dans l'art. Des exemples de telles méthodes, ainsi que des fragments fonctionnels de décorine, sont notamment décrits dans EP0636175 A1.

La protéine mise en œuvre selon l'invention peut par ailleurs comprendre un peptide signal, en particulier un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence peptidique SEQ ID NO : 6.

Par au moins 70% d'identité de séquences avec la séquence SEQ ID NO : 6, on entend désigner une séquence d'acides aminés comprenant au moins 70 %, au moins 71 %, au moins 72 %, au moins 73 %, au moins 74 %, au moins 75 %, au moins 76 %, au moins 77 %, au moins 78%, au moins 79 %, au moins 80 %, au moins 81 %, au moins 82 %, au moins 83 %, au moins 84 %, au moins 85 %, au moins 86 %, au moins 87 %, au moins 88%, au moins 89%, au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98% au moins 99% ou au moins 100% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6.

Une protéine mise en œuvre selon l'invention peut être glycosylée ou non glycosylée, et en particulier peut être glycosylée, plus particulièrement glycosylée sur sa partie N-terminale.

La présente invention concerne également la mise en œuvre d'une séquence d'acides nucléiques codant pour la décorine. Une telle séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention code ainsi pour une protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, , ou un fragment de celle-ci, telles que définies ci-dessus, et en particulier pour une protéine comprenant la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celle-ci.

Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut en particulier avoir au moins 70% d'identité de séquence avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5.

Par au moins 70% d'identité de séquences avec la séquence SEQ ID NO : 3, la séquence SEQ ID NO : 4 ou la séquence SEQ ID NO : 5, on entend désigner une séquence d'acides nucléiques comprenant au moins 70 %, au moins 71 %, au moins 72 %, au moins 73 %, au

moins 74 %, au moins 75 %, au moins 76 %, au moins 77 %, au moins 78%, au moins 79 %, au moins 80 %, au moins 81 %, au moins 82 %, au moins 83 %, au moins 84 %, au moins 85 %, au moins 86 %, au moins 87 %, au moins 88%, au moins 89%, au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 5 96%, au moins 97%, au moins 98% au moins 99% ou au moins 100% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 3, la séquence SEQ ID NO : 4 ou la séquence SEQ ID NO : 5.

En particulier, une séquence d'acides nucléiques peut avoir au moins 75 % d'identité de séquence, en particulier au moins 80 % d'identité de séquences, plus particulièrement 85 % d'identité de séquence voire 90 % d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 3, la 10 séquence SEQ ID NO : 4 ou la séquence SEQ ID NO : 5.

Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut par ailleurs en outre comprendre une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal, en particulier une séquence nucléotidique ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 7.

15 Par au moins 70% d'identité de séquences avec la séquence SEQ ID NO : 7, on entend désigner une séquence d'acides nucléiques comprenant au moins 70 %, au moins 71 %, au moins 72 %, au moins 73 %, au moins 74 %, au moins 75 %, au moins 76 %, au moins 77 %, au moins 78%, au moins 79 %, au moins 80 %, au moins 81 %, au moins 82 %, au moins 83 %, au moins 84 %, au moins 85 %, au moins 86 %, au moins 87 %, au moins 88%, au moins 20 89%, au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98% au moins 99% ou au moins 100% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 7.

Une séquence d'acides nucléiques selon l'invention peut être choisie parmi une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) ou une séquence d'acide ribonucléique (ARN). Une 25 séquence d'acide désoxyribonucléique peut être de l'ADN génomique ou de l'ADNc. Une séquence d'acide ribonucléique peut être notamment choisie parmi les ARNm, les ARNt, les ARNr, les siARN, les ARN en épingle à cheveux courts (shARN) ou les microARN (miARN). Selon un mode de réalisation particulier, une séquence d'acides nucléiques selon l'invention peut être une séquence d'ARNm. Une telle séquence d'ARNm peut en particulier 30 correspondre à la séquence transcrite à partir d'une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention ayant au moins 70% d'identité de séquence avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5, et en particulier

correspondre à la séquence transcrite à partir d'une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5.

5 Une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut en particulier être comprise dans un vecteur.

Tel qu'utilisé ici, le terme « vecteur » fait référence à une molécule d'acide nucléique capable de transporter un autre acide nucléique auquel il a été lié. Ce terme entend par ailleurs également désigner tout support de délivrance, tel qu'une composition associée à un acide nucléique thérapeutique ou prophylactique afin d'augmenter sa délivrance cellulaire.

10 En particulier, le vecteur peut être un vecteur viral, un vecteur non viral, un plasmide, un lipide, un liposome ou une nanoparticule. Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, la séquence d'acides nucléiques peut être comprise dans un vecteur, le vecteur étant en particulier un vecteur viral, un vecteur non viral, un plasmide, un lipide, un liposome ou une nanoparticule.

15 Des vecteurs pouvant particulièrement convenir sont ceux capables de répliquer autonome et/ou d'expression des séquences d'acides nucléiques auxquels ils sont liés. Les vecteurs capables de diriger l'expression de gènes auxquels ils sont fonctionnellement liés sont appelés ici "vecteurs d'expression".

20 Selon un mode de réalisation, une séquence d'acide nucléique mise en œuvre selon l'invention peut être comprise dans un plasmide. En général, les vecteurs d'expression utiles dans les techniques d'ADN recombinant se présentent souvent sous la forme de "plasmides" qui désignent des boucles d'ADN double brin circulaires qui, sous leur forme de vecteur, ne sont pas liées au chromosome.

25 Les vecteurs peuvent également être de l'ADN épisomique, des chromosomes artificiels de levure, ou des minichromosomes.

Les vecteurs peuvent être d'origine viral, et on parle alors de vecteurs viraux.

30 Un vecteur viral convenant selon la présente invention peut être choisi dans le groupe consistant en un rétrovirus, en particulier un lentivirus, un adénovirus, un virus adéno-associé et un vecteur de type virus. Dans un mode de réalisation particulier, le vecteur viral est un vecteur rétroviral ou un vecteur viral adéno-associé (AAV).

Un vecteur viral convenant selon la présente invention peut également être choisi parmi les

vecteurs Herpes simplex virus (HSV), et en particulier parmi les vecteurs HSV non-réplicatifs. On parle ainsi ici de vecteur HSV. Un tel vecteur peut en particulier être un vecteur Virus herpes simplex 1 ou 2 (HSV-1 ou HSV-2), et en particulier un vecteur HSV-1.

Par « vecteur HSV », on entend un vecteur viral dérivé du virus de l'herpès simplex,  
5 notamment de type 1 (HSV1).

Les vecteurs rétroviraux sont des particules virales qui contiennent un génome viral dérivé de rétrovirus, n'ont pas la capacité d'auto-renouvellement et ont la capacité d'introduire une séquence d'acides nucléiques dans une cellule. Par exemple, un vecteur rétroviral peut être un vecteur alpha-rétroviral, un vecteur gamma-rétroviral, un vecteur lentiviral ou un vecteur  
10 spuma-rétroviral, de préférence un vecteur lentiviral. De tels vecteurs ont été largement utilisés dans des traitements de thérapie génique et d'autres applications de délivrance de gènes.

Dans un mode de réalisation particulier, le vecteur rétroviral est un vecteur lentiviral. Les termes « vecteur lentiviral », tels qu'utilisés ici, désignent un vecteur viral dérivé de rétrovirus  
15 complexes tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Des vecteurs lentiviraux dérivés de n'importe quelle souche et sous-type peuvent être utilisés. Le vecteur lentiviral peut être basé sur un lentivirus humain ou de primate tel que le VIH ou un lentivirus non humain tel que le virus de l'immunodéficience féline, le virus de l'immunodéficience simienne et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Dans un mode de réalisation particulier, le  
20 vecteur lentiviral est un vecteur à base de VIH et notamment un vecteur à base de VIH-1.

Les vecteurs AAV sont des particules virales qui contiennent un génome dérivé d'AAV, n'ont pas la capacité d'auto-renouvellement et ont la capacité d'introduire une séquence d'acides nucléiques dans une cellule.

Par « vecteur AAV », on entend un vecteur viral dérivé d'un sérotype de virus adéno-associé,  
25 y compris, sans limitation, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. Un vecteur AAV peut avoir un ou plusieurs des gènes de type sauvage d'AAV supprimés en totalité ou en partie, de préférence les gènes rep et/ou cap, mais conservent des séquences ITR flanquantes fonctionnelles. Les séquences ITR fonctionnelles sont nécessaires pour le sauvetage, la réplication et l'encapsidation du virion AAV. Ainsi, un vecteur AAV est défini ici pour  
30 inclure au moins les séquences requises en cis pour la réplication et l'encapsidation (par exemple, les ITR fonctionnels) du virus. Les ITR n'ont pas besoin d'être les séquences nucléotidiques de type sauvage et peuvent être modifiées, par ex. g, par l'insertion, la délétion

ou la substitution de nucléotides, tant que les séquences permettent une récupération fonctionnelle, une réplication et une encapsidation. Les vecteurs AAV sont construits en utilisant des techniques connues pour fournir au moins comme composants liés de manière opérationnelle dans la direction de la transcription, des éléments de contrôle comprenant une

5 région d'initiation de la transcription, l'ADN d'intérêt et une région de terminaison de la transcription. Les éléments de contrôle sont sélectionnés pour être fonctionnels dans une cellule de mammifère. La construction résultante qui contient les composants liés de manière opérationnelle est liée (5' et 3') avec des séquences ITR d'AAV fonctionnelles. Par

10 « répétition terminale inversée du virus adéno-associé » ou « AAVITR », on entend les régions reconnues dans l'art trouvées à chaque extrémité du génome de l'AAV qui fonctionnent ensemble en cis comme origines de réplication de l'ADN et comme signaux d'encapsidation pour le virus. Les ITR d'AAV, conjointement avec la région codante rep d'AAV, permettent l'excision et la récupération efficaces de, et l'intégration d'une séquence nucléotidique interposée entre deux ITR flanquants dans un génome de cellule de mammifère.

15 Les séquences nucléotidiques des régions ITR d'AAV sont connues. Voir, e. g., Kotin, 1994 ; Berns, KI « Parvoviridae and their Replication » in *Fundamental Virology*, 2<sup>nd</sup> Edition, (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) pour la séquence AAV-2. Tel qu'utilisé ici, un « AAV ITR » ne comprend pas nécessairement la séquence nucléotidique de type sauvage, mais peut être modifié, par ex. par exemple, par l'insertion, la délétion ou la substitution de nucléotides. De

20 plus, l'ITR d'AAV peut être dérivé de l'un quelconque de plusieurs sérotypes d'AAV, y compris, sans s'y limiter, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. En outre, en 5' et 3', Les ITR qui flanquent une séquence nucléotidique sélectionnée dans un vecteur AAV ne doivent pas nécessairement être identiques ou dérivés du même sérotype ou isolat d'AAV, tant qu'ils fonctionnent comme prévu, i. e., pour permettre l'excision et le sauvetage de la

25 séquence d'intérêt à partir d'un génome ou d'un vecteur de cellule hôte, et pour permettre l'intégration de la séquence hétérologue dans le génome de la cellule receveuse lorsque les produits du gène AAV Rep sont présents dans la cellule.

La séquence d'acides nucléiques d'intérêt est en particulier liée de manière fonctionnelle à des éléments de contrôle qui dirigent la transcription ou l'expression de celle-ci chez le sujet

30 *in vivo*. De tels éléments de contrôle peuvent comprendre des séquences de contrôle normalement associées au gène sélectionné. En variante, des séquences de contrôle hétérologues peuvent être employées. Des séquences de contrôle hétérologues utiles comprennent généralement celles dérivées de séquences codant pour des gènes de

mammifères ou viraux. Des exemples comprennent, mais sans s'y limiter, le promoteur de la phosphoglycérate kinase (PKG), le promoteur précoce SV40, le promoteur LTR du virus de la tumeur mammaire de souris ; promoteur tardif majeur d'adénovirus (Ad MLP) ; un promoteur du virus de l'herpès simplex (HSV), un promoteur du cytomégalovirus (CMV) tel que la  
5 région du promoteur précoce immédiat du CMV (CMVIE), le promoteur du virus du sarcome de Roux (RSV), un promoteur hybride CMV/béta-actine (CAG), des promoteurs synthétiques, des promoteurs hybrides, etc.

Un virus recombinant est un virus qui comprend une séquence d'acides nucléiques recombinante, c'est à dire une séquence d'acides nucléiques qui comprend des parties qui  
10 n'apparaissent pas naturellement ensemble dans le cadre d'une séquence unique ou qui ont été réarrangées par rapport à une séquence naturelle. Ainsi, un « vecteur viral recombinant » (e.g. un « vecteur rétroviral recombinant » ou un « vecteur AAV recombinant ») désigne un vecteur viral comprenant dans son génome une séquence nucléotidique recombinante (ou transgène).

15 Le vecteur peut également être un lipide, notamment une vésicule lipidique telle qu'un liposome, des micelles de nanoparticules lipidiques solides (SLN) ou des nanoparticules polymériques. Des composés à base de lipides qui ne sont pas des liposomes peuvent en outre être utilisés. Par exemple, les lipofectines et les cytoflectines sont des ions positifs à base de lipides qui se lient à un acide nucléique chargé négativement et forment un complexe qui peut  
20 transporter l'ADN à travers une membrane cellulaire.

Selon un mode de réalisation particulier, une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut se présenter sous la forme d'une construction d'ADN, en particulier sous la forme d'une construction d'ADN destinée au transfert non viral d'acides nucléiques dans les cellules musculaires de la sphère oculaire du patient en ayant besoin.

25 Ainsi, une séquence d'acide nucléique mise en œuvre selon l'invention peut également contenir une ou plusieurs régions supplémentaires, par exemple des éléments régulateurs de petite ou grande taille à la disposition de l'homme du métier comme une région promotrice (constitutive, régulée, inductible, tissu-spécifique, etc.), par exemple des séquences permettant et/ou favorisant l'expression dans le tissu ciblé (e.g. dans la sphère oculaire du  
30 patient) ou cellules (e.g. EPR ou photorécepteurs), un signal de terminaison de la transcription, telle qu'une séquence de polyadénylation en 3' de la séquence nucléotidique, des séquences de sécrétion, une origine de répllication et/ou de localisation nucléaire des séquences signal (nls) qui améliorent davantage le transfert de polynucléotide vers le noyau

cellulaire. De telles séquences nls ont été décrites dans l'art antérieur, y compris la séquence de l'antigène T large du SV40.

Selon un mode de réalisation particulier, la séquence d'acides nucléiques peut se présenter sous la forme d'une construction d'ADN destinée au transfert non viral d'acides nucléiques dans les cellules musculaires de la sphère oculaire du patient en ayant besoin, ladite construction d'ADN étant caractérisée en ce qu'elle comprend:

(a) optionnellement une origine de répllication bactérienne ou procaryotique, en particulier bactérienne,

(b) une ou plusieurs séquences favorisant l'expression de l'ADN dans la sphère oculaire du patient,

(c) une séquence nucléotidique codant :

- pour une protéine thérapeutique comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celle-ci, et

- optionnellement pour un peptide signal permettant la sécrétion de cette première protéine thérapeutique, en particulier pour un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6;

ce peptide signal, lorsqu'il est présent, étant contiguë de la séquence de la protéine thérapeutique, en N-terminal de ladite première protéine thérapeutique,

(d) un promoteur permettant l'expression de cette protéine thérapeutique dans la sphère oculaire du patient ; et

(e) optionnellement une séquence de polyadénylation en 3' de la séquence nucléotidique.

En particulier, la séquence nucléotidique codant:

- pour une protéine thérapeutique comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celle-ci, et

- optionnellement pour un peptide signal permettant la sécrétion de cette première protéine thérapeutique, en particulier pour un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6;

comprend plus particulièrement:

- une séquence d'acides nucléiques codant pour une protéine thérapeutique, cette séquence d'acides nucléiques ayant au moins 70% d'identité de séquence avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de

la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5 et plus particulièrement comprend une séquence choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5 ; et

5 - optionnellement une séquence nucléotidique ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 7, ce peptide signal, lorsqu'il est présent, étant contiguë de la séquence de la protéine thérapeutique, en N-terminal de ladite première protéine thérapeutique.

La séquence d'acide nucléique sous forme d'une construction d'ADN, en particulier de forme circulaire ou d'ADN nu, peut être complexée avec tout agent chimique, biochimique ou  
10 biologique, peut être inséré dans un vecteur, etc., lorsqu'elle est administrée au patient.

Selon un mode de réalisation particulier, la construction d'ADN est de forme circulaire.

Tel qu'utilisé ici, le terme « de forme circulaire » ou « fermée » fait référence à toute molécule d'acide nucléique formant une molécule circulaire. Dans le cas d'ADN circulaire double-brin, on distingue les molécules ouvertes, dites relâchées, et les molécules fermées qui souvent sont  
15 superenroulées.

Selon un mode de réalisation particulier, la construction d'ADN est de l'ADN nu.

Tel qu'utilisé ici, le terme « ADN nu » fait référence à toute molécule d'acide nucléique qui n'est pas associée à un agent synthétique, biosynthétique, chimique, biochimique ou biologique améliorant la délivrance ou le transfert dudit ADN, ou facilitant son entrée dans la  
20 cellule. Le plasmide est une forme particulière d'ADN nu selon l'invention.

De plus, la séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peut en outre comprendre des marqueurs sélectionnables utiles pour sélectionner, mesurer et surveiller les résultats de transfert d'acide nucléique (transfert vers quels tissus, durée d'expression, etc.).

Les types de systèmes d'expression et de gènes rapporteurs qui peuvent être utilisés ou  
25 adaptés pour une utilisation sont bien connus dans l'art. Par exemple, des gènes codant pour une activité luciférase, une activité phosphatase alcaline ou une activité protéine fluorescente verte sont couramment utilisés.

La séquence d'acide nucléique peut être préparée et produite selon les techniques classiques de l'ADN recombinant, telles que l'amplification, la culture dans des cellules hôtes  
30 procaryotes ou eucaryotes, la synthèse enzymatique, la purification, etc. Les techniques de la technologie de l'ADN recombinant sont connues de l'homme du métier.

## Compositions pharmaceutiques

Une protéine ou une séquence d'acides nucléiques mise en œuvre selon l'invention peuvent être présentes dans une composition pharmaceutique comprenant également au moins un milieu pharmaceutiquement acceptable.

- 5 Le terme « pharmaceutiquement » ou « pharmaceutiquement acceptable » désigne des entités moléculaires et des compositions qui ne produisent pas de réaction indésirable, allergique ou autre, lorsqu'elles sont administrées à un mammifère, en particulier un être humain, selon le cas. Un support ou excipient pharmaceutiquement acceptable fait référence à une charge solide, semi-solide ou liquide non toxique, un diluant, un matériau d'encapsulation ou un
- 10 auxiliaire de formulation de tout type.

- Les supports, excipients ou diluants pharmaceutiquement acceptables comprennent les diluants et les charges qui sont pharmaceutiquement acceptables pour les procédés de l'invention, sont stériles et peuvent être choisis parmi une solution saline tamponnée isotonique neutre à légèrement acide (y compris les phosphates, le chlorure, etc. ), des
- 15 solutions ou suspensions aqueuses ou oléagineuses et plus préférentiellement parmi le saccharose, le tréhalose, les tensioactifs, les protéines et les acides aminés. Le support, excipient ou diluant pharmaceutiquement acceptable est de préférence formulé en utilisant des agents dispersants, mouillants, suspenseurs, apaisants, isotoniques ou augmentant la viscosité, des stabilisants, des conservateurs et des tampons appropriés pour former une solution
- 20 isotonique. Le support pharmaceutiquement acceptable particulier et le rapport du composé actif au support sont déterminés par la solubilité et les propriétés chimiques de la composition, le mode particulier d'administration et la pratique pharmaceutique standard. L'homme du métier comprendra comment formuler de tels véhicules par des techniques connues.

- 25 Un exemple de stabilisant est l'édétate disodique. Des exemples d'agents isotoniques sont la glycérine, le propylèneglycol, le polyéthylèneglycol, l'acide éthylène diamine tétra-acétique, le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le sorbitol et le mannitol ou similaires. Des exemples de tampons sont l'acide citrique, l'hydrogénophosphate de sodium, l'acide acétique glacial et le trométamol ou similaire. Des exemples d'agents d'ajustement du pH sont l'acide
- 30 chlorhydrique, l'acide citrique, l'acide phosphorique, l'acide acétique, l'hydroxyde de sodium, le carbonate de sodium et l'hydrogénocarbonate de sodium ou similaire. Un exemple d'agents apaisants est l'alcool benzylique ou similaire. Des exemples de conservateurs sont le chlorure de benzalkonium, le chlorure de benzéthonium, les esters de p-hydroxybenzoate, le benzoate

de sodium et le chlorobutanol ou similaire.

Une viscosité supérieure à celle des solutions aqueuses simples peut être souhaitable pour augmenter l'absorption oculaire de la protéine ou de la séquence d'acides nucléiques, pour diminuer la variabilité dans la distribution des formulations, pour diminuer la séparation

5 physique des composants d'une suspension ou d'une émulsion de formulation et/ou autrement pour améliorer la formulation ophtalmique. Ces agents augmentant la viscosité comprennent, par exemple, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, la méthylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose ou d'autres agents connus de l'homme du métier. De tels agents sont  
10 typiquement employés à un niveau d'environ 0,01 % à environ 2 % en poids par rapport au poids total de la composition pharmaceutique.

Les formes de préparation de la composition pharmaceutique destinées à être administrées, en particulier dans les cellules musculaires de la sphère oculaire, sont de préférence des

15 préparations liquides. Les préparations liquides peuvent être préparées, par exemple, en dissolvant la protéine ou la séquence d'acides nucléiques dans du BSS (Balanced Salt Solution), une solution de glycérine, une solution d'acide hyaluronique et similaire. Une composition particulière comprend par exemple du BSS (60%) et de l'acide hyaluronique (40%). Un stabilisant, un agent isotonique, un tampon, un ajusteur de pH, un agent apaisant, un conservateur, des électrolytes, tels que le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium  
20 et/ou le chlorure ou similaire peuvent éventuellement être ajoutés en quantité adéquate au liquide.

A titre illustratif, la concentration de décorine sous forme protéique administrée peut aller d'environ 0,01 mg/mL à environ 1000 mg/mL. Dans certains cas, la concentration peut être comprise entre 0,05 mg/mL et 750 mg/mL, tandis que dans d'autres cas, elle peut être

25 comprise entre 0,1 mg/mL et 500 mg/mL. Dans d'autres modes de réalisation encore, la concentration va d'environ 0,2 mg/mL à environ 250 mg/mL, d'environ 0,3 mg/mL à environ 200 pg/mL, d'environ 0,5 mg/mL à environ 100 mg/mL, d'environ 0,75 mg/mL à environ 50 mg/mL, d'environ 0,75 mg/mL à environ 25 mg/mL, ou d'environ 1,0 mg/mL à environ 10 mg/mL.

30 La composition pharmaceutique peut comprendre un ou plusieurs adjuvant(s) supplémentaire(s). L'adjuvant peut être choisi parmi toute substance, mélange, soluté ou composition facilitant ou augmentant l'activité biologique de la protéine ou de la séquence d'acides nucléiques tel que tout agent biologique, synthétique ou biosynthétique améliorant la

délivrance ou le transfert dudit agent et assimilable à un vecteur (comme transporteur de livraison) selon l'invention. L'adjuvant peut être conditionné et administré séparément ou séquentiellement à partir de la composition contenant l'agent prophylactique ou thérapeutique et/ou à un site d'injection distinct. Le traitement avec de multiples agents et/ou adjuvants  
5 selon l'invention n'a pas besoin d'être effectué en utilisant un mélange d'agents et/ou d'adjuvants mais peut être effectué en utilisant des préparations pharmaceutiques séparées. Les préparations n'ont pas besoin d'être délivrées exactement au même moment, mais peuvent être coordonnées pour être délivrées à un patient pendant la même période de traitement, c'est-à-dire à une semaine ou un mois d'intervalle.

10 En outre, une composition pharmaceutique telle que décrite peut comprendre un ou plusieurs agent(s) thérapeutique(s). Des exemples non limitatifs d'agents thérapeutiques comprennent des agents perméabilisants tels qu'un virus, une vésicule lipidique, l'acide hyaluronique, des ions positifs à base de lipides, des émulsions polycationiques, des peptides cationiques, des polyplex, etc.; des antibiotiques et des agents antimicrobiens tels que le chlorhydrate de  
15 tétracycline, la leucomycine, la pénicilline, les dérivés de la pénicilline, l'érythromycine, le sulfathiazole et la nitrofurazone ; les anesthésiques locaux tels que la benzocaïne ; les vasoconstricteurs tels que le chlorhydrate de phényléphrine, le chlorhydrate de tétrahydrozoline, le nitrate de naphazoline, le chlorhydrate d'oxymétazoline et le chlorhydrate de tramazoline ; les cardiotoniques tels que la digitaline et la digoxine ; des vasodilatateurs  
20 tels que la nitroglycérine et le chlorhydrate de papavérine ; des antiseptiques tels que le chlorhydrate de chlorhexidine, l'hexylrésorcinol, le chlorure de déqualinium et l'éthacridine ; des enzymes telles que le chlorure de lysozyme et la dextranase ; des hypotenseurs; des sédatifs; es agents antitumoraux; des agents anti-inflammatoires stéroïdiens tels que l'hydrocortisone, la prednisone, la fluticasone, la prednisolone, la triamcinolone, l'acétonide,  
25 la dexaméthasone, la bétaméthasone, la béclo méthasone et le dipropionate de béclo méthasone ; des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'acétaminophène, l'aspirine, l'aminopyrine, la phénylbutazone, l'acide méfanamique, l'ibuprofène, le diclofénac sodique, l'indométhacine, la colchicine et le probénocide ; les anti-inflammatoires enzymatiques tels que la chymotrypsine et la bromélaïne sératiopeptidase ; des agents anti-histaminiques tels  
30 que le chlorhydrate de diphénhydramine, le maléate de chlorophéniramine et la clémastine ; agents anti-allergiques; et des composés analgésiques.

Une protéine ou une séquence d'acides nucléiques selon l'invention peut être administrée à l'individu en ayant besoin en combinaison avec un ou plusieurs actifs biologiquement actifs,

en particulier dans une composition pharmaceutique telle que décrite précédemment.

Des agents biologiquement actifs sont par exemple choisis parmi le VEGF, l'angiogénine, l'angiopoïétine-1, le DeM, les facteurs de croissance des fibroblastes acides ou basiques (aFGF et bFGF), le FGF-2, la follistatine, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le facteur de dispersion (SF), la leptine, la Midkine, le facteur de croissance placentaire (PGF), le facteur de croissance des cellules endothéliales dérivées des plaquettes (PD-ECGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes-BB (PDGF-BB), la pléiotrophine (PTN), le RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor), la Progranuline, la Proliferine, le TGF-alpha, le PEDF, le TGF-beta, le TNF-alpha, le VEGF, le VPF, le CNTF, le BDNF, le GDNF, le PEDF, le NT3, le BFGF, l'angiopoïétine, l'éphrine, l'EPO, le NGF, l'IGF, le GMF, l'aFGF, le NT5, le Gax, une hormone de croissance, l'[alpha]-1-antitrypsine, la calcitonine, la leptine, une apolipoprotéine, une enzyme pour la biosynthèse des vitamines, des hormones ou des neuromédiateurs, des chimiokines, des cytokines telles que IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, un récepteur de celui-ci, un anticorps bloquant l'un quelconque desdits récepteurs, TIMP tel que TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, l'angioarrestine, l'endostatine telle que l'endostatine XVIII et l'endostatine XV, l'ATF, l'angiostatine, un la protéine de fusion de l'endostatine et de l'angiostatine, le domaine hémopexine C-terminal de la métalloprotéinase-2 matricielle, le domaine kringle 5 du plasminogène humain, une protéine de fusion de l'endostatine et le domaine kringle 5 du plasminogène humain, l'inhibiteur de la ribonucléase placentaire, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le Platelet Factor-4 (PF4), un fragment de prolactine, la Proliferin-Related Protein (PRP), l'antithrombine III anti-angiogénique, le Cartilage-Derived Inhibitor (CDI), un fragment du complément de CD59, les inhibiteurs C3a et C5a, complexe d'attaque inhibiteurs membranaires, facteur H, l'ICAM, le VCAM, la cavéoline, le PKC zêta, les protéines de jonction, les JAMs, le CD36, la vasculostatine MERTK, la vasostatine (fragment de calréticuline), la thrombospondine, la fibronectine, en particulier fragment de fibronectine gro-bêta, une héparinase, la gonadotrophine chorionique humaine (hCG), l'interféron alpha/bêta/gamma, la protéine inductible par l'interféron (IP-10), la monokine induite par l'interféron-gamma (Mig), la protéine inductible par l'interféron alpha 10 (IP10), une protéine de fusion de Mig et IP10, le récepteur soluble Fms-Like Tyrosine kinase 1 (FLT-1), la Kinase insert Domain Receptor (KDR), les régulateurs de l'apoptose tels que Bcl-2, Bad, Bak, Bax, Bik, Bcl-X short isoform et Gax, les fragments ou dérivés celui-ci et autres, ainsi que leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation particulier, ladite protéine ou ladite séquence d'acides nucléiques est administrée à l'individu en ayant besoin en combinaison avec une protéine de type anti-VEGF et/ou une séquence codant pour une protéine de type anti-VEGF, notamment choisie dans le groupe constitué de S-Flt1, l'aflibercept, le conbercept, le bevacizumab, le ranibizumab et le brolucizumab, plus particulièrement avec de l'aflibercept et/ou une séquence codant pour de l'aflibercept.

Les niveaux de dosage réels d'adjuvants et des d'agents thérapeutiques dans les compositions de la présente invention peuvent être adaptés de manière à obtenir une quantité efficace pour obtenir une activité biologique souhaitée. Il faut comprendre, cependant, que le niveau de dose spécifique pour un patient particulier dépendra d'une variété de facteurs, y compris le poids corporel, l'état de santé général, le sexe, le régime alimentaire, le temps, les taux d'absorption et d'excrétion, la combinaison avec d'autres médicaments et la gravité de la maladie particulière traitée.

15 Mises en œuvre des peptides et/ou séquences d'acides nucléiques de la décorine

Une protéine, une séquence d'acides nucléiques, notamment sous forme d'une construction ADN destinée au transfert non viral d'acides nucléiques dans les cellules musculaires de la sphère oculaire du patient en ayant besoin, ou une composition pharmaceutique mises en œuvre selon l'invention peuvent être administrées à l'individu en ayant besoin selon les méthodes d'administrations connues dans l'art, bien entendu adaptées à la forme administrée (protéique ou nucléotidique).

En particulier, des méthodes d'administrations convenant selon la présente invention sont particulièrement adaptées à une administration oculaire.

Une protéine, une séquence d'acides nucléiques, notamment sous forme d'une construction ADN destinée au transfert non viral d'acides nucléiques dans les cellules musculaires de la sphère oculaire du patient en ayant besoin, ou une composition pharmaceutique mises en œuvre selon l'invention peuvent ainsi être administrées directement dans l'œil par injection dans le tissu oculaire, par exemple par injection périoculaire, conjonctivale, sous-ténonale, intracamérale, intravitréenne, intraoculaire, sous-rétinienne, sous-conjonctivale, rétrobulbaire, suprachoroïdienne ou intracanaliculaire ; par application directe dans l'œil à l'aide d'un cathéter ou d'un autre dispositif de placement tel qu'une pastille rétinienne, un insert intraoculaire, un suppositoire ou un implant composé d'un matériau poreux, non poreux ou

gélatineux ; par des gouttes ou des pommades oculaires topiques ; ou par un dispositif à libération lente dans le cul-de-sac ou implanté à proximité de la sclérotique (transscléral) ou dans la sclérotique (intrascléral) ou suprachoroïdien ou à l'intérieur de l'œil.

Les méthodes d'administration incluent notamment des méthodes d'injection dans la sphère  
5 oculaire du patient, en particulier dans les cellules musculaires de la sphère oculaire du patient, en particulier dans les cellules du muscle ciliaire du patient.

Par exemple, une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une composition pharmaceutique peut être administrée par injection sous-conjonctivale peu invasive, injection intravitréenne traditionnelle, administration transclérale, injection sous-ténonienne,  
10 administration suprachoroïdale ou par d'autres procédés appropriés pour administrer la solution contenant la protéine à couches de tissus à l'arrière de l'œil.

Le moyen pour injecter une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une composition pharmaceutique dans la sphère oculaire peut être une aiguille d'injection ou de préférence un cathéter souple ou une microcanule. Les techniques d'injection peuvent impliquer l'utilisation  
15 de micro-aiguilles, telles qu'une micro-aiguille de calibre 38 ou d'autres micro-aiguilles de calibre approprié.

Dans d'autres modes de réalisation, une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une composition pharmaceutique peut être administrée par injection dans le tissu scléral. Dans certains modes de réalisation, la délivrance peut se faire par délivrance transclérale à l'aide  
20 d'un implant de collagène qui est imprégné de la protéine, la séquence d'acides nucléiques ou la composition pharmaceutique puis placé dans la conjonctive.

Des procédés d'injection dans la sphère oculaire sont bien connus dans l'art comme par exemple dans EP3137497 B1 ou dans EP1871890 B1.

Des dispositifs pour injecter une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une  
25 composition pharmaceutique dans la sphère oculaire sont également bien connus dans l'art et décrits, notamment, dans EP2997938 B1 ou dans EP3108933 B1.

Selon un mode de réalisation particulier, une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une composition pharmaceutique selon l'invention peut être administrée par application topique sur l'œil, notamment par l'intermédiaire de gouttes pour les yeux ; par au moins une  
30 injection intravitréenne, ou une injection sous-conjonctivale, ou une injection supra-choroïdienne, ou une injection sous-rétinienne ; et/ou à l'aide d'un implant intravitréen.

Dans un mode de réalisation particulier, une composition pharmaceutique mise en œuvre selon l'invention est une formulation de gouttes ophtalmiques. Le collyre est fourni dans toute formulation généralement utilisée, par exemple, sous la forme d'un collyre aqueux tel qu'une solution de collyre aqueuse, une suspension de collyre aqueuse, une solution de collyre visqueuse, une solution de collyre solubilisée et autres, ou sous la forme d'un collyre non aqueux tel qu'une solution de collyre non aqueuse, une suspension de collyre non aqueuse et autres. Lorsque la composition mise en œuvre selon la présente invention est préparée sous forme de collyre aqueux, elle contient de préférence un additif habituellement utilisé dans un collyre aqueux. Les exemples d'un tel additif comprennent les conservateurs, les agents isotoniques, les agents tampons, les stabilisateurs, les régulateurs de pH ou autres.

Selon un mode de réalisation particulier, une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une composition pharmaceutique mise en œuvre selon l'invention est administrée par au moins une injection intravitréenne.

En particulier, une protéine, une séquence d'acides nucléiques ou une composition pharmaceutique peut être administrée au patient par injection dans un muscle ciliaire, optionnellement suivie d'une étape d'électrotransfert dans les cellules du muscle ciliaire.

En particulier, l'administration au patient d'une protéine, d'une séquence d'acides nucléiques ou d'une composition pharmaceutique peut être suivie d'une étape d'électrotransfert.

L'électrotransfert consiste en une étape d'électroporation appliquée après une injection locale d'une protéine ou d'une séquence d'acides nucléiques, en particulier d'un plasmide, et permet d'augmenter l'efficacité de transfection de la molécule injectée.

L'exposition de la région où la protéine, la séquence d'acides nucléiques ou la composition pharmaceutique a été délivrée à un champ électrique peut être réalisée par une électroporation extra-oculaire. L'électroporation est en effet adaptée ou augmente la perméabilité d'une membrane cellulaire et/ou d'au moins une partie d'un tissu ciblé à un agent biologiquement actif tel qu'une protéine ou une séquence d'acides nucléiques. De plus, une brève impulsion électrique avec une intensité de champ donnée est utilisée pour permettre le transport ou la migration d'agents à travers le tissu ou à travers les membranes cellulaires dans les cellules, par un effet électrophorétique. La technique d'électroporation est bien connue de l'homme du métier.

Dans un mode de réalisation particulier, un champ électrique constitué d'une ou plusieurs impulsion(s) électrique(s) est appliqué.

L'intensité de champ peut être comprise entre environ 1 et 600 volts, de préférence 1 et 400 volts, encore plus préférentiellement entre environ 1 et 200 volts, avantageusement entre environ 10 et 100 volts, ou 15 et 70 volts.

La durée totale d'application du champ électrique peut être comprise entre 0,01 milliseconde et 1 seconde, de préférence entre 0,01 et 500 millisecondes, plus préférentiellement entre 1 et 500 millisecondes, encore plus préférentiellement supérieure à 1 ou 10 millisecondes. Dans un mode de réalisation particulier, la durée totale d'application du champ électrique est comprise entre 10 millisecondes et 100 millisecondes et est de préférence de 20 millisecondes.

10 Les impulsions électriques appliquées peuvent être comprises par exemple entre 1 et 100 000. Leur fréquence peut être comprise entre 0,1 et 1000 hertz. Il s'agit de préférence d'une fréquence régulière.

Selon un mode de réalisation particulier, l'électrotransfert est réalisé à raison de 8 impulsions électriques carrées unipolaires (200V/cm, 10 ms, 5 Hz) générées par un électroporateur  
15 similaire à celui décrit dans Touchard *et al.* (J Gene Med. 2010 Nov;12(11):904-19).

Des impulsions électriques peuvent également être délivrées de manière irrégulière les unes par rapport aux autres, la fonction décrivant l'intensité du champ électrique en fonction du temps pour une impulsion étant de préférence variable.

Les impulsions électriques peuvent être des impulsions d'ondes unipolaires ou bipolaires.  
20 Elles peuvent être choisies par exemple parmi des impulsions d'ondes carrées, des impulsions d'ondes décroissantes exponentiellement, des impulsions d'ondes unipolaires oscillantes de durée limitée, des impulsions d'ondes bipolaires oscillantes de durée limitée, ou d'autres formes d'ondes. Préférentiellement, les impulsions électriques comprennent des impulsions d'ondes carrées ou des impulsions d'ondes bipolaires oscillantes.

25 En particulier, lorsque la rétine est ciblée, deux modes de réalisation sont possibles. Dans un premier mode de réalisation, le champ électrique est appliqué à l'aide de deux électrodes, l'une desdites électrodes étant introduite dans l'espace suprachoroïdien et l'autre étant appliquée sur la surface de l'œil du côté opposé où l'injection suprachoroïdienne a été réalisée. Dans un deuxième mode de réalisation, le champ électrique est appliqué à l'aide de deux électrodes,  
30 l'une desdites électrodes est appliquée sur la surface de la sclérotique adjacente à la région où l'injection suprachoroïdienne a été effectuée et l'autre est appliquée sur la surface de l'œil ( ex. sclérotique ou conjonctive) du côté opposé où l'injection suprachoroïdienne a été réalisée.

Les électrodes sont de préférence choisies parmi une électrode de type fil et une électrode de type plaque-contact, chaque type d'électrode étant éventuellement adapté pour être appliqué de manière réversible sur la surface de l'œil. De préférence, l'électrode du type plaque-contact est incurvée.

- 5 Dans un mode de réalisation particulier, l'électrode plaque-contact est de préférence réalisée en un matériau rigide et de forme incurvée adaptée à la géométrie de la surface de la sclérotique ou de l'œil (par exemple la conjonctive). Les électrodes sont avantageusement réalisées en un métal conducteur non oxydant choisi par exemple parmi l'iridium ou le platine. Typiquement, le champ électrique est appliqué avec des moyens de dispositifs tels que décrits dans l'exemple 2. Une méthode d'électrotransfert convenant selon l'invention est décrite dans 10 Bloquel *et al.* « Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis » (FASEB J 2006; 20: 389–391) en modifiant la voie d'injection par une approche transsclérale (Touchard “The ciliary smooth muscle electrotransfer: basic principles and potetial for sustained intraocular production of 15 therapeutic proteins”, J Gene Med. 2010 Nov;12(11):904-19). Des méthodes d'électroporation convenant à une administration dans la sphère oculaire sont notamment décrits dans EP2266656 B1.

La présente demande couvre également une méthode pour traiter d'une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin, comprenant au moins une étape d'administration d'une 20 protéine, ou d'un fragment de celle-ci, telle que décrite précédemment, audit individu, dans laquelle :

- (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez ledit individu ; et  
(ii) la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de 25 séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celle-ci.

La demande couvre également une méthode de réparation ou de régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en ayant besoin comprenant au moins une étape d'administration audit individu d'une protéine comprenant une séquence protéique 30 comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou d'un fragment de celle-ci.

En outre, la demande couvre une méthode pour traiter une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin, comprenant au moins une étape d'administration audit individu d'une séquence d'acides nucléiques, dans laquelle :

- 5 (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) ; et  
(ii) la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine, ou un fragment de celle-ci, selon l'invention.

La demande concerne également une méthode de réparation ou de régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en ayant besoin comprenant au moins  
10 une étape d'administration audit individu d'une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine, ou un fragment de celle-ci, selon l'invention.

La demande concerne également une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou d'un fragment de celle-ci, pour son utilisation dans la reconstruction d'un épithélium  
15 pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu recevant ou ayant reçu une greffe d'EPR.

La demande couvre également une méthode pour améliorer la reconstruction d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu ayant reçu une greffe d'EPR comprenant au moins une étape d'administration audit individu d'une protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1  
20 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou d'un fragment de celle-ci.

Par ailleurs, la demande concerne une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine, ou un fragment de celle-ci, pour son utilisation dans la reconstruction d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu ayant reçu une greffe d'EPR.

La demande concerne également une méthode reconstruction d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu ayant reçu une greffe d'EPR comprenant au moins une étape  
25 d'administration audit individu d'une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine, ou un fragment de celle-ci, selon l'invention.

L'invention est décrite ci-dessous de façon plus détaillée au moyen des exemples suivants qui sont présentés à titre d'illustration uniquement.

### 30 **Exemple 1**

Les inventeurs ont tout d'abord mis en évidence la capacité de la Décorine seule, administrée en tant que telle, à restaurer l'EPR dans un modèle de néovascularisation choroïdienne induite par laser chez le rat, un modèle expérimental largement utilisé pour étudier la DMLA.

#### A. Modèle de néovascularisation choroïdienne chez le rat

L'induction d'une néovascularisation choroïdienne (NVC) chez le rat Long-Evans a été induite à J0 en créant une rupture de la membrane de Bruch, une couche qui sépare la choroïde de l'EPR, par photocoagulation au laser. Brièvement, après anesthésie et dilatation des pupilles, six à huit impacts laser ont été réalisées autour du nerf optique à une distance de 2 ou 3 diamètres du disque optique avec un laser Argon (532 nm) monté sur une lampe à fente (175mW, 0,1 s et 50  $\mu$ m). La présence d'une bulle témoignait de la rupture de la membrane de Bruch et confirmait un impact laser réussi.

#### 10 B. Tests comparatifs

Nous avons utilisé la protéine Décorine recombinante de souris (référence 1060-DE de chez R&D Systems) qui partage 87% d'identité de séquence amino-acide avec la Décorine de rat. L'injection intravitréenne de Décorine a été réalisée à J0 après induction laser et à J7 à une concentration finale de 10  $\mu$ g/mL dans le vitré de rat (n = 6 rats). Une solution contrôle de tampon phosphate (PBS) ne contenant pas de Décorine a également été injecté dans le vitré d'un groupe de rats contrôle (n = 6 rats).

#### C. Montages à plat de l'EPR et de la choroïde et quantification de la restauration de l'EPR

A J14, les yeux ont été énucléés, fixés dans du PFA à 4 % pendant 15 minutes à température ambiante et sectionnés au niveau du limbe ; la cornée et le cristallin ont été éliminés. La rétine a été séparée du complexe EPR-choroïde. Huit incisions radiales ont été pratiquées sur le complexe EPR-choroïde, qui a ensuite été montée à plat et post-fixée à l'acétone pendant 15 minutes à -20°C. Après lavage au PBS, le complexe EPR-choroïde a été montée à plat et les filaments d'actine dans les cellules de l'EPR ont été mis en évidence par la technique d'immunofluorescence à l'aide de Phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa Fluor 647 (ThermoFisher) pendant 30 minutes à température ambiante puis observée au microscope confocal (Zeiss LSM710, Le Pecq, France). Les images de l'EPR ont été capturées à l'aide d'une caméra vidéo numérique couplée à un système informatique. Pour chaque lésion induite par le laser, la reconstitution de l'EPR a été gradée qualitativement en évaluant la structure des cellules de l'EPR et la surface de couverture de la lésion par l'EPR. Les scores ont été établis par selon les critères suivants : grade 0 : pas de couverture de la lésion par l'EPR ou couverture avec des cellules anormales (pas hexagonales) ; grade 0.5 : couverture partielle de la lésion avec des cellules EPR hexagonales ; grade 1 : couverture complète de la lésion avec des cellules EPR hexagonales (forme normale des cellules de l'EPR).

### Résultats des tests

Le score moyen de couverture des lésions NVC par les cellules de l'EPR a été comparé entre les deux groupes de rats à J14.

5 Les résultats obtenus sont présentés en Figures 1A et 1B.

En Figure 1A, il peut tout d'abord être observé que le score moyen des rats du groupe contrôle (PBS) est inférieur à 0,5 (environ 0,4). A l'inverse, le score moyen des rats du groupe traité avec de la Décorine est nettement supérieur à 0,5 (environ 0,7) ce qui est

10 statistiquement différent du résultat obtenu avec le groupe contrôle ( $p = 0.013$ , test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

La Figure 1B représente l'incidence des différents scores attribués par lésion dans chacun des groupes de rats (score de 1, 0,5 ou 0 de haut en bas pour chaque groupe). Il apparaît ainsi que plus de 50% des lésions se sont vu attribuer un score de 1 dans le groupe traité avec de la Décorine, contre seulement 25% dans le groupe contrôle.

15

Cela vient ainsi matérialiser la capacité de la Décorine à restaurer un épithélium pigmentaire rétinien au niveau d'une rétine présentant un EPR déchiré voire un EPR ayant disparu.

### Exemple 2

20 Les inventeurs ont par ailleurs également démontré la capacité de la Décorine à restaurer l'EPR dans un modèle de néovascularisation choroïdienne persistante induite par double impact laser chez le rat.

#### A. Modèle de Néovascularisation choroïdienne persistante chez le rat

25 Le modèle de néovascularisation choroïdienne induite par double impact laser, initialement décrit chez la souris (Little *et al.*, Transl Vis Sci Technol. 2020 Mar 9;9(4):3) et reproduit ici chez le rat Brown Norway imite la maladie humaine chronique dans sa stabilité et sa persistance.

30 Une première rupture de la membrane de Bruch est réalisée à J -7 puis un second impact laser est réalisé à J0 sur chacun des lésions précédemment induite à J -7. Brièvement, après anesthésie et dilatation des pupilles, quatre impacts laser ont été réalisées autour du nerf optique à une distance d'environ 2 diamètres du disque optique avec un laser Argon (532 nm)

monté sur une lampe à fente (200mW, 0,1 s et 50 µm). La présence d'une bulle témoignait de la rupture de la membrane de Bruch et confirmait un impact laser réussi.

Par la suite, la vascularisation rétinienne et choroïdienne est visualisée à J14 et J28 par angiographie à la fluorescéine (FA) et au vert d'indocyanine (ICG) selon une méthode

- 5 habituelle bien connue de l'homme du métier. Après dilatation des pupilles, un mélange de fluorescéine et de vert d'indocyanine a été injectée dans la veine caudale des rats. Les angiogrammes en phase précoce et tardive ont été enregistrés respectivement 20 secondes-2 minutes et 5-7 minutes après l'injection du mélange fluorescéine/vert d'indocyanine. Pour
- 10 chaque lésion induite par le laser, la fuite de fluorescéine a été gradée qualitativement en évaluant l'augmentation de la taille/intensité de la fuite du colorant entre les phases précoce et tardive. Les scores angiographiques ont été établis par selon les critères suivants : grade 0, pas d'hyperfluorescence ; grade 1, légère hyperfluorescence sans augmentation d'intensité ni de
- 15 taille ; grade 2, hyperfluorescence augmentant en intensité mais pas en taille ; grade 3, hyperfluorescence augmentant à la fois en intensité et en taille.
- Comme illustré en Figure 2, en l'absence de traitement, le pourcentage de lésions de grade 3 mesuré chez les rats lors de cet examen se situe entre 55 et 60% à J14 et J28.

## B. Tests comparatifs

### 20 Plasmide

Une construction d'ADN comprenant une séquence d'acide nucléique selon l'invention codant pour de la Décorine a été préparée selon les méthodes conventionnelles et est représentée en Figure 5.

Cette construction (également nommée ci-après construction plasmide A) comprend :

- 25 - la séquence SEQ ID NO : 5 encodant la Décorine de séquence SEQ ID NO : 1;
- la séquence SEQ ID NO : 7 encodant le peptide signal de la Décorine de séquence SEQ ID NO : 6 ;
- ainsi que la séquence SEQ ID NO : 8 encodant l'Aflibercept de séquence SEQ ID NO : 9 ;
- ces deux séquences étant sous le contrôle de promoteurs ubiquitaires.

- 30 L'injection du tampon de formulation (véhicule) uniquement a été utilisée comme comparatif.

### Animaux

Des rats tels que précédemment décrits sont utilisés conformément aux dispositions du protocole ARVO (pour Association for Research in Vision and Ophthalmology). Les rats sont

anesthésiés par injection intramusculaire d'une dose de kétamine (40 mg/kg) et de xylazine (4 mg/kg) avant injection du plasmide A (30 µg – n=12) ou d'une solution contrôle (véhicule) (30 µg – n=12) et électrotransfert au jour J-3 (i.e. 3 jours avant le second impact laser tel que détaillé précédemment).

- 5 En parallèle, deux autres groupes contrôles sont également traités par injection intravitréenne d'Aflibercept (15µg – n=12) ou d'une solution BSS (n=12) à J0 (i.e. immédiatement après le second impact laser tel que détaillé précédemment).

Électrotransfert au niveau du muscle ciliaire du rat

- 10 L'électrotransfert est réalisé comme décrit dans Bloquel *et al.* « Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis » (*FASEB J 2006; 20: 389–391*) en modifiant la voie d'injection par une approche transsclérale (Touchard “The ciliary smooth muscle electrotransfer: basic principles and potetial for sustained intraocular production of therapeutic proteins”, *J Gene Med. 2010*
- 15 *Nov;12(11):904-19*). Les plasmides sont injectés à raison de 30 µg dans 10 µL de solution Tris-EDTA NaCl, dans le muscle ciliaire des animaux à l'aide d'une seringue adaptée. Les impulsions électriques sont administrées à l'aide d'une électrode filaire en iridium/platine de 250 µm de diamètre. Cette électrode interne est introduite dans le tunnel transscléral créé par l'aiguille d'injection des plasmides. L'électrode externe est une feuille d'acier inoxydable
- 20 courbée pour épouser la forme de l'œil et placée au niveau du limbe face à l'électrode interne. L'électrotransfert est réalisé à raison de 8 impulsions électriques carrées unipolaires (200V/cm, 10 ms, 5 Hz) générées par un électroporateur similaire à celui décrit dans Touchard et al (*J Gene Med. 2010 Nov;12(11):904-19*).

- 25 C. Histologie et quantification de la restauration de l'EPR

A J30, les yeux ont été énucléés, fixés dans du PFA à 4 %, enrobés dans de la paraffine, puis sectionnés en coupes de 5 µm d'épaisseur. Les coupes réalisées dans la partie centrale des lésions CNV ont été sélectionnées et préparées pour un marquage immunohistologique.

- Brièvement, les coupes ont été déparaffinées à l'aide de bains de xylène puis réhydratées avec
- 30 des bains d'éthanol successifs de 100 % à 70 % d'éthanol. Les coupes ont été immunomarquées en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine RPE65 spécifiquement exprimée dans les cellules de l'EPR (Sigma Aldrich) et un anticorps dirigé contre le Collagène 1 (Abcam) pour marquer la zone fibro-vasculaire. Ces anticorps primaires ont ensuite été détectés par des anticorps secondaires (ThermoFisher Scientific, France), anti-

souris Alexa fluor 488 (RPE65) et anti-lapin Alexa fluor 594 (Collagène 1). Une contre-coloration au DAPI a été utilisée pour localiser les structures rétiniennes. Les coupes ont été montées avec un milieu Fluoromount (Sigma Aldrich, France) sous une lamelle couvre-objet pour l'examen microscopique à l'aide d'un microscope confocal (Spinning disk CSU-W1, 5 Leica). La surface d'immunomarquage positive au marqueur RPE65 (cellules de l'EPR) rapportée à la taille totale de la lésion NVC et le pourcentage de couverture de la lésion NVC par des cellules de l'EPR (positive pour RPE65) ont été mesurés à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images assistée par ordinateur (ImageJ).

## 10 Résultats

A J14 et à J28, la fuite vasculaire induite par double impact laser a été évaluée pour chaque lésion et le pourcentage relatif de lésions de grade 3 comparé entre chacun des 4 groupes (voir Figure 3). Il apparaît ainsi que le pourcentage de lésion de grade 3 à J14 et J28 est réduit de plus de 50% dans le groupe traité avec le plasmide A par rapport au groupe ayant reçu le 15 tampon de formulation seul. A l'inverse, l'administration d'Aflibercept seul réduit le pourcentage de lésion de grade 3 à J14 et J28 de seulement, respectivement, 6 à 22% par rapport au groupe ayant reçu une solution BSS. Cela vient ainsi matérialiser la capacité d'un plasmide codant pour la Décorine et Aflibercept à réduire très significativement la fuite vasculaire au niveau d'une rétine présentant une néovascularisation choroïdienne.

20 A J30, la couverture de la rétine par des cellules de l'EPR a été évaluée pour chaque lésion et comparée entre chacun des 4 groupes (Résultats présentés en Figure 4B). Plus particulièrement, la surface d'immunomarquage positive au marqueur RPE65 (indiquant la présence de cellules de l'EPR) rapportée à la taille totale de la lésion NVC a également été comparées entre chacun des 4 groupes susmentionnés (voir Figure 4A).

25

Ces expériences matérialisent le fait que la décorine, administrée en tant que telle ou via l'administration d'un plasmide l'encodant, permet une restauration significative de l'épithélium pigmentaire rétinien. A l'inverse, l'administration du tampon de formulation seul, mais également l'administration d'Aflibercept seul ou d'une solution BSS ne permettent 30 pas d'observer une quelconque restauration de cet épithélium endommagé.

**Listage de séquences****SEQ ID NO : 1** : Séquence peptidique de la Décorine

GPFQQRGLFDFMLEDEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRQCCHLRVVQCSDLGLD  
 KVPKDLPPDTLLDLQNNKITEIKDGDGDFKNLKNLHALILVNNKISKVSPGAFTPLVKL  
 5 ERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKVTFNGLNQMIVIELGTNPLKSS  
 GIENGAFAQGMKKLSYIRIADTNITSIPQGLPPSLTELHLDGKNKISRVDAAASLKGLNNLA  
 KLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQVVYLHNNNIS  
 VVGSSDFCPPGHNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRSIQGLGNYK

10 **SEQ ID NO : 2** : Séquence peptidique de la Décorine

DEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRQCCHLRVVQCSDLGLDKVPKDLPPDTLLDL  
 QNNKITEIKDGDGDFKNLKNLHALILVNNKISKVSPGAFTPLVKLERLYLSKNQLKELPE  
 KMPKTLQELRAHENEITKVRKVTFNGLNQMIVIELGTNPLKSSGIENGAFAQGMKKLS  
 YIRIADTNITSIPQGLPPSLTELHLDGKNKISRVDAAASLKGLNNLAKLGLSFNSISAVDNG  
 15 SLANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQVVYLHNNNISVVGSSDFCPPGHNTK  
 KASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRSIQGLGNYK

**SEQ ID NO : 3** : Séquence nucléotidique codant pour la Décorine

ggaccgtttcaacagagaggcttatttgactttatgctagaagatgaggcttctgggataggcccagaagttcctgatgaccgcgacttc  
 20 gagccctccctagggccagtggtccctccgctgcaatgccatcttcgagtggtccagtggtctgattgggtctggacaaagtgccaa  
 aggatcttccccctgacacaactctgctagacctgcaaaacaacaaataaccgaaatcaagatggagactttaagaacctgaagaa  
 ccttcacgcattgattctgtcaacaataaaatagcaaaagtagtctctggagcattacaccttggtaagttggaacgactttatctgtcc  
 aagaatcagctgaaggaattgccagaaaaatgccccaaactcttcaggagctgcgtgcccatgagaatgagatcaccaaagtgcga  
 aaagttactttcaatggactgaaccagatgattgtcatagaactgggcaccaatccgctgaagagctcaggaattgaaaatggggcttcc  
 25 cagggaatgaagaagctctcctacatccgattgctgataccaatataccagcattcctcaaggtcttctccttcccttacggaattaca  
 tcttgatggcaacaaaatcagcagagttgatgcagctagcctgaaaggactgaataattggctaagttgggattgagttcaacagcatc  
 tctgctgtgacaatggctctctggccaacacgcctcatctgaggagcttcacttgacaacaacaagcttaccagagtacctgggtggg  
 ctggcagagcataagtacatccaggtgtctacctcataacaacaatatctctgtagttggatcaagtgacttctgccacctggacaca  
 acacaaaaaggcttcttattcgggtgtgagcttttcagcaacccgggtccagtagctgggagatacagccatccacctcagatgtgteta  
 30 cgtgcgctctgccattcaactcgaaactataagtaa

**SEQ ID NO : 4** : Séquence nucléotidique codant pour la Décorine

gatgaggcttctgggataggcccagaagttcctgatgaccgcgacttcgagccctccctagggccagtggtcccttccgctgcaatg  
 ccatcttcgagtggtccagtggtctgattgggtctggacaaagtgccaaaggatcttccccctgacacaactctgctagacctgcaaac

aacaaaataaccgaaatcaaagatggagactttaagaacctgaagaacctcacgcattgattctgtcaacaataaaatagcaaagfta  
 gtcttgagacatttacacctttggtgaagttggaacgactttatctgtccaagaatcagctgaaggaattgccagaaaaaatgccaaaa  
 ctcttcaggagctgctgccccatgagaatgagatcaccaaagtgcgaaaagtactttcaatggactgaaccagatgattgcatagaac  
 tgggcaccaatccgctgaagagctcaggaattgaaaatggggctttccagggatgaagaagctctctacatccgcattgctgatacc  
 5 aatataccagcattcctcaaggtcttccctcccttacggaattacatcttgatggcaacaaaatcagcagagttgatgcagctagcct  
 gaaaggactgaataatttggttaagttgggattgagttcaacagcatctctgctgttgacaatggctctctggccaacacgcctcatctga  
 gggagcttcacttgacaacaacaagcttaccagagtacctggtgggctggcagagcataagttacatccaggtgtctaccttcataac  
 aacaatatctctgtagttggatcaagtgacttctgccacctggacacaacacaaaaaggcttcttattcgggtgtgagcttttcagcaa  
 cccggtccagtaactgggagatacagccatccaccttcagatgtgtctacgtgcgctctgccattcaactcggaactataagtaa

10

**SEQ ID NO : 5** : Séquence nucléotidique codant pour la Décorine

ggaccgtttcaacagagaggcttatttgactttatgctagaagatgaggcctctggaatcggacctgaggtgccccgacgacagagactt  
 cgaaccttctctgggcccctgtgtcccccttcagatgccagtgatctgagagtggtgcagtcgacgcacctgggcccctgataaggtgc  
 ccaaggacctgcctcctgacaccacactgctggacctgcagaacaacaagatcaccgagatcaaggacggcgacttcaagaacctg  
 15 aagaatctgcacgccctgatcctggtaacaacaaaatcagcaaggtgtcccctggcgccttcacacctctggtaagctggaaagact  
 gtacctgagcaagaaccagctgaaagaactgcccgagaagatgcccagacactgcaagagctgcgggcccacgagaacgagatc  
 accaaagtgcggaaagtgacctcaacggcctgaaccagatgatcgtgatcagctgggccaatctctgaagtccagcggcattg  
 agaacggcgccttccagggcatgaagaagctgagctacatccggatcggcgcaccaacatcaccagcattcctcagggcctgcctc  
 caagcctgacagagctgcatctggacggcaacaagattagcagagtgagcggcctctctgaagggcctgaacaatctggccaaa  
 20 ctgggcccctgagcttcaacagcatcagcgcctggataacggcagcctggccaacacacctcactgaggggaactgcacctggataac  
 aacaagctgaccagagtgacctggcggactggccgagcacaagttacatccaggtggtgtatctccacaacaacaacatctccgtctg  
 ggcagcagcagcttctgtcctcctggccacaataccaagaaggccagctactctggcgtgtccctgttcagcaaccccgtgcagtaactg  
 ggagatccagcctagcaccttagatgcgtgtacgtgcggagcggccatccagctgggcaactacaaatga

25

**SEQ ID NO : 6** : Séquence peptidique du peptide signal natif de la Décorine

MKATIILLLLAQVSWA

**SEQ ID NO : 7** : Séquence nucléotidique codant pour le peptide signal natif de la Décorine

atgaaggccactatcatcctccttctgcttgcacaagtttctgggct

30

**SEQ ID NO : 8** : séquence nucléotidique codant pour l'Aflibercept

cagcgacaccggcagacccttctggaatgtacagcgagatccccgagatcatccacatgaccgagggcccgcgagctggtgatcc  
 cttgcagagtgaccagcccaacatcaccgtgacactgaagaagttccctctggacacactgatccccgacggcaagaggatcatctg  
 ggacagcagaaaagggttcatcatcagcaacgccacatacaaaagagatcggactgctgacatgcgaggccaccgtgaacggccatc

tgtacaagaccaactatctgaccaccgccagaccaacacatcatcgacgtggtgctgagccccagccacggcatcgagctgagcg  
tgggcgagaagctggtgctgaactgcaccgccagaaccgagctgaatgtgggcatcgactcaactgggagfaccagctccaag  
caccagcacaagaaactggtgaaccgggatctgaaaaccagagcggcagcgagatgaagaagttctgagcacactgaccatcga  
cggcgtgaccagaagcgaccaaggactgtacacatgcgccgccagcagcggactgatgaccaagaagaacagcacattcgtccgg  
5 gtgcacgagaaggacaagaccacacatgccacatgccagccccagagctgctgggaggccccctccgtgttctgtccctcca  
aagcccaaggacactctgatgatcagcagaacccccgaagtgacatgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccagaagtga  
gttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagccccagagaggaacagtacaacagcacatacagagt  
gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaagactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaagtctcaacaaggctctgccagcccc  
atcgaagaccatcagcaaggccaagggccagcctcgcgagccccaaagtgtacacactgctccaagccgggacgagctgacca  
10 agaatcaagtgtctctgacatgtctggtgaaaggcttctacccagcgatatgccgtggaatgggagagcaacggccagccccgaga  
acaactacaagaccaccctcccgtgctggacagcagcggcagcttcttctgtactccaaactgaccgtggacaagagcagatggca  
gcaaggcaacgtgtcagctgcagcgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacaccagaagtctctgtctctgagccccggcaa  
gtga

15 **SEQ ID NO : 9** : séquence peptidique de l'Aflibercept

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSR  
KGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKL  
VLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTR  
SDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT  
20 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## REVENDEICATIONS

**1.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin :

- (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez ledit individu ; et  
(ii) la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

**2.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation selon la revendication 1, ladite pathologie oculaire étant choisie dans le groupe constitué d'une déchirure de l'épithélium pigmentaire de la rétine ; d'une atrophie géographique ; d'une choroidérémie ; et d'une dystrophie maculaire héréditaire, en particulier choisie parmi la maladie de Stargardt, la dégénérescence vitelliforme juvénile de la macula ou maladie de Best, la dystrophie aréolaire centrale, la dégénérescence maculaire de Sorsby, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord, et la dégénérescence maculaire en aile de papillon.

**3.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour la réparation ou la régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en ayant besoin, la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

**4.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation dans la reconstruction d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu recevant ou ayant reçu une greffe d'EPR, la protéine comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2.

**5.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ladite protéine comprenant en outre un peptide signal, en particulier un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6.

**6.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, la protéine étant administrée audit individu en ayant besoin par application topique sur l'œil, par exemple par l'intermédiaire de gouttes pour les yeux ; par injection intravitréenne ; par injection sous-conjonctivale ; par injection supra-choroïdienne ; par injection sous-rétinienne ; et/ou à l'aide d'un implant intravitréen.

**7.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie oculaire chez un individu en ayant besoin :

- (i) la pathologie oculaire étant caractérisée par une déchirure ou une disparition, partielle ou totale, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) ; et

(ii) la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 et 5, ou un fragment de celle-ci.

**8.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon la revendication 6, ladite pathologie oculaire étant choisie dans le groupe constitué d'une déchirure de l'épithélium

5 pigmentaire de la rétine, d'une atrophie géographique, d'une choroïdérémie ; et d'une dystrophie maculaire héréditaire, en particulier choisie parmi la maladie de Stargardt, la dégénérescence vitelliforme juvénile de la macula ou maladie de Best, la dystrophie aréolaire centrale, la dégénérescence maculaire de Sorsby, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord, et la dégénérescence maculaire en aile de papillon.

10 **9.** Séquence d'acide nucléique pour la réparation ou la régénération d'un épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez un individu en ayant besoin, la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 et 5, ou un fragment de celle-ci.

15 **10.** Séquence d'acide nucléique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, ladite séquence d'acides nucléiques comprenant une séquence ayant au moins 70% d'identité de séquence avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisie dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 3, de la séquence SEQ ID NO : 4 et de la séquence SEQ ID NO : 5.

20 **11.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, ladite séquence d'acides nucléiques comprenant en outre une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal, en particulier une séquence nucléotidique ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 7.

25 **12.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, ladite séquence d'acides nucléiques étant comprise dans un vecteur, le vecteur étant en particulier un vecteur viral, un vecteur non viral, un plasmide, un lipide, un liposome ou une nanoparticule.

30 **13.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, ladite séquence d'acides nucléiques se présentant sous la forme d'une construction d'ADN destinée au transfert non viral d'acides nucléiques dans les cellules musculaires de la sphère oculaire de l'individu en ayant besoin, ladite construction d'ADN étant caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) optionnellement une origine de répllication bactérienne ou procaryotique,

(b) une ou plusieurs séquences favorisant l'expression de l'ADN dans la sphère oculaire du patient,

(c) une séquence nucléotidique codant :

- pour une protéine thérapeutique comprenant une séquence protéique comprenant au moins 85% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celle-ci, et

5 - optionnellement pour un peptide signal permettant la sécrétion de cette première protéine thérapeutique, en particulier pour un peptide signal ayant au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6 ;

ce peptide signal, lorsqu'il est présent, étant contiguë de la séquence de la protéine thérapeutique, en N-terminal de ladite première protéine thérapeutique,

10 (d) un promoteur permettant l'expression de cette protéine thérapeutique dans la sphère oculaire du patient ; et

(e) optionnellement une séquence de polyadénylation en 3' de la séquence nucléotidique.

**14.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, ladite construction d'ADN étant administrée à l'individu en ayant

15 besoin par injection dans un muscle ciliaire, optionnellement suivie d'une étape d'électrotransfert dans les cellules du muscle ciliaire.

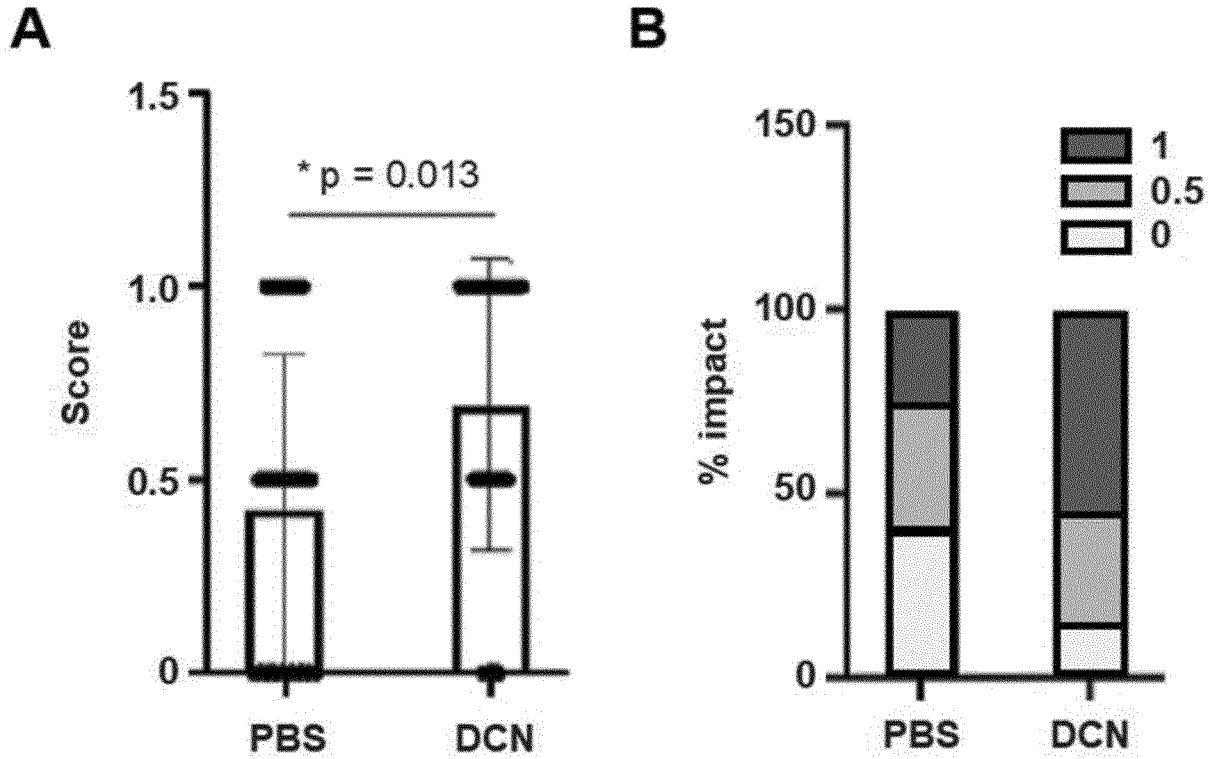
**15.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon la revendication 13 ou 14, dans laquelle la construction d'ADN est de forme circulaire.

20 **16.** Séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon la revendication 12 ou 13, dans laquelle la construction d'ADN est de l'ADN nu.

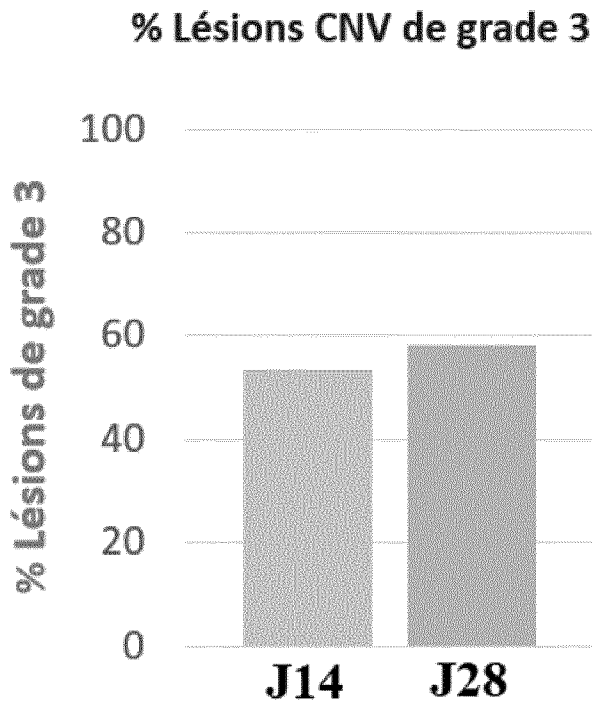
**17.** Protéine, ou fragment de celle-ci, ou séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, ladite protéine, ou un fragment de celle-ci, ou ladite séquence d'acides nucléiques étant présente dans une composition pharmaceutique comprenant également au moins un milieu pharmaceutiquement acceptable.

25 **18.** Protéine, ou fragment de celle-ci, pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 17 ou séquence d'acides nucléiques pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 17, ladite protéine, ou fragment de celle-ci, ou ladite séquence d'acides nucléiques étant administrée à l'individu en ayant besoin en combinaison avec une protéine de type anti-VEGF et/ou une séquence codant pour un protéine de type  
30 anti-VEGF, notamment choisie dans le groupe constitué de de S-Flt1, l'aflibercept, le conbercept, le bevacizumab, le ranibizumab et le brolucizumab, plus particulièrement avec de l'aflibercept et/ou une séquence codant pour de l'aflibercept.

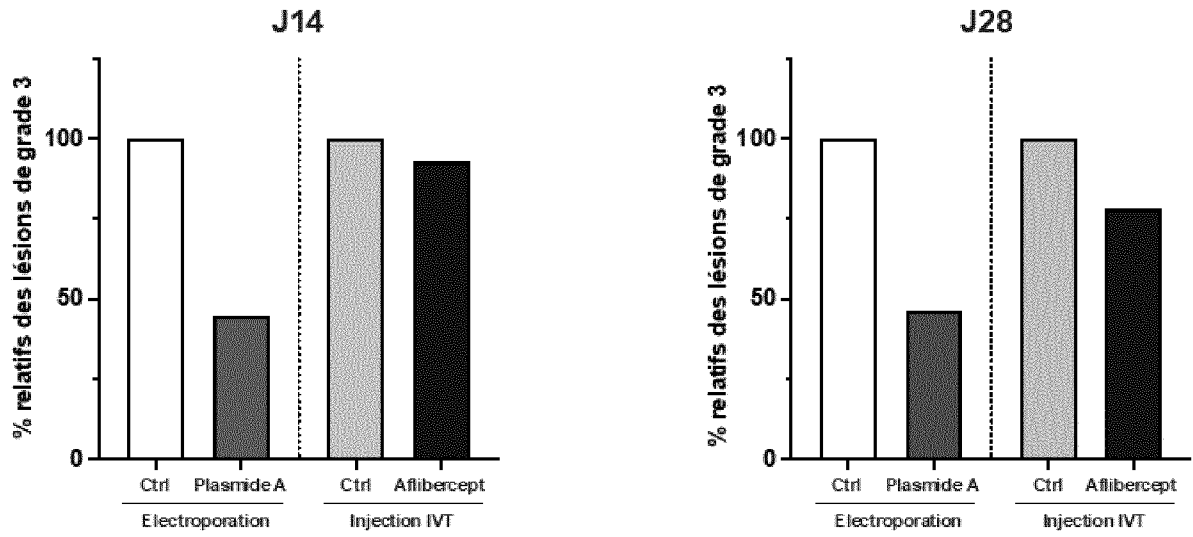
[Fig 1]



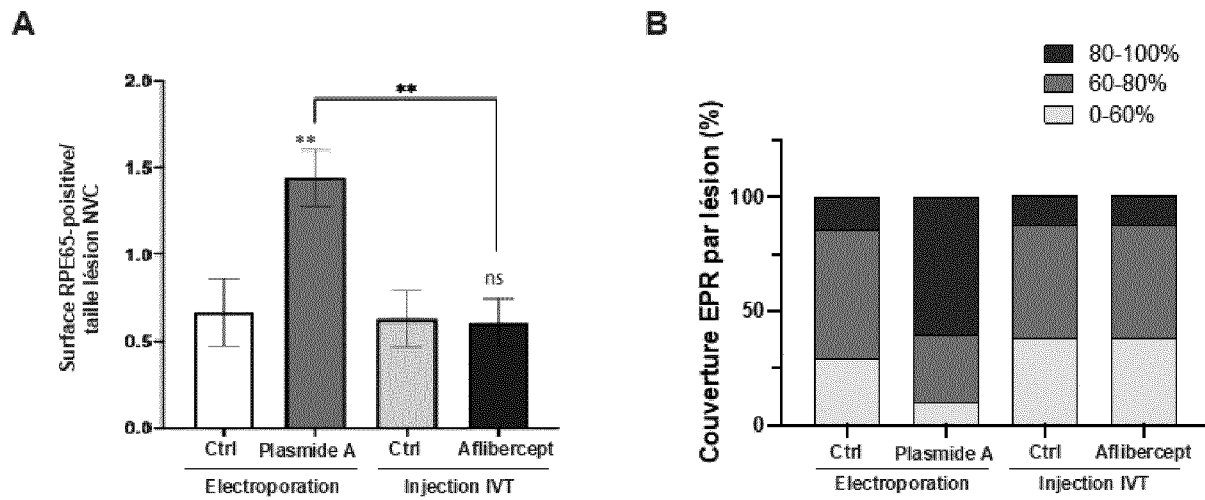
[Fig 2]



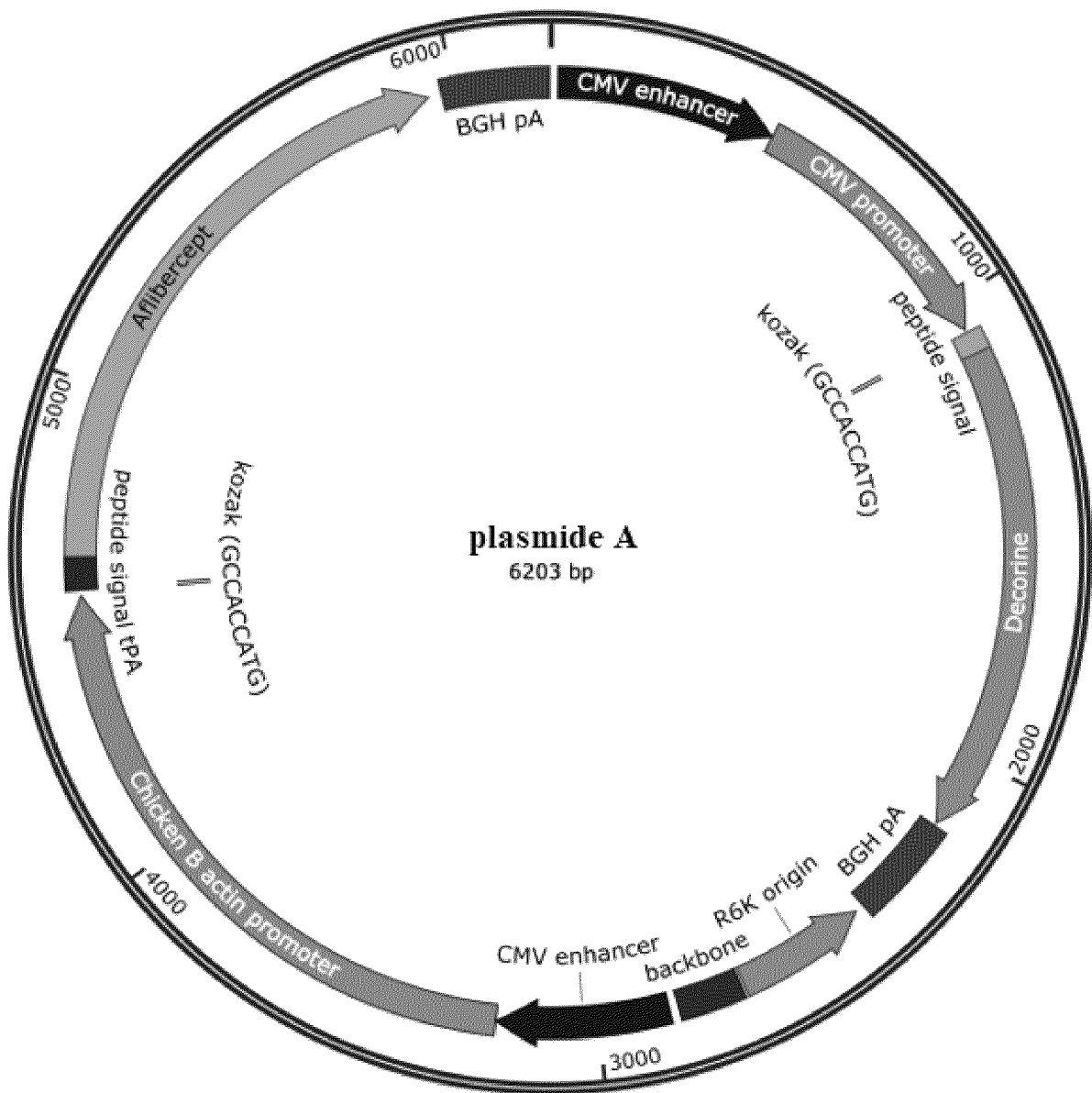
[Fig 3]



[Fig 4]



[Fig 5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2024/060741

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 38/17(2006.01); A61K 9/00(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C12N 15/62(2006.01); C12N 15/85(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 45/06(2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P; C12N; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019229116 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV PARIS DESCARTES [FR] ET AL.) 05 December 2019 (2019-12-05) cited in the application page 2, lines 20-22; claims 1,3,8,9	1-3,5,6,18
X	US 2013045926 A1 (DEVORE DALE P [US] ET AL) 21 February 2013 (2013-02-21) cited in the application paragraph [0006]; claims; examples	1-3,5,6
X	FR 3111913 A1 (EYEVENSYS [FR]) 31 December 2021 (2021-12-31) the whole document	7-18
Y	BEHAR-COEN FRANCINE ET AL. "Decorin for choroidal neovascularization fibrosis and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium" 01 May 2022 (2022-05-01), ANNU MEET ASSOC RES VIS OPHTHALMOL (ARVO), Retrieved from the Internet: <a href="https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2781357">https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2781357</a> XP093102989 the whole document	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>02 July 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 July 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/EP <b>European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands (Kingdom of the)</b> Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer <b>Durrenberger, Anne</b>  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2024/060741

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIE XINYI ET AL. "Decorin Protects Retinal Pigment Epithelium Cells from Oxidative Stress and Apoptosis via AMPK-mTOR-Regulated Autophagy" , US, Vol. 2022, 29 March 2022 (2022-03-29), pages 1-17, OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY, Retrieved from the Internet: <a href="http://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2022/3955748.xml">http://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2022/3955748.xml</a> DOI: 10.1155/2022/3955748 ISSN: 1942-0900, XP093101036 cited in the application the whole document	1-18
Y	WANG SHUAI ET AL. "Decorin Prevents Retinal Pigment Epithelial Barrier Breakdown Under Diabetic Conditions by Suppressing p38 MAPK Activation" <i>INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY &amp; VISUAL SCIENCE</i> , US, Vol. 56, No. 5, 08 May 2015 (2015-05-08), page 2971 DOI: 10.1167/iovs.14-15874 ISSN: 1552-5783, XP093101466 the whole document	1-18
Y	US 2013195806 A1 (GAY ROGER [US] ET AL) 01 August 2013 (2013-08-01) claims 1,30, 209	4
Y,P	BIGTO KARINE ET AL. "Efficacy and durability of EYS809 non-viral gene therapy in nAMD preclinical models" <i>ARVO ANNUAL MEETING 2023</i> , 01 June 2023 (2023-06-01), pages 1-2, Retrieved from the Internet: <a href="https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2786515">https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2786515</a> XP093181079 the whole document	1-18

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/EP2024/060741**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019229116	A1	05 December 2019	NONE	
US	2013045926	A1	21 February 2013	AU 2010325908	A1 07 June 2012
				BR 112012013303	A2 01 March 2016
				CA 2781309	A1 09 June 2011
				CN 102639141	A 15 August 2012
				EA 201290442	A1 30 November 2012
				EP 2506862	A1 10 October 2012
				JP 2013512924	A 18 April 2013
				KR 20120114282	A 16 October 2012
				US 2013045926	A1 21 February 2013
				WO 2011069046	A1 09 June 2011
FR	3111913	A1	31 December 2021	AU 2021298865	A1 02 February 2023
				CA 3182197	A1 06 January 2022
				CN 115768486	A 07 March 2023
				EP 4171636	A1 03 May 2023
				FR 3111913	A1 31 December 2021
				IL 299487	A 01 February 2023
				JP 2023531289	A 21 July 2023
				KR 20230028509	A 28 February 2023
				US 2024189448	A1 13 June 2024
				WO 2022003063	A1 06 January 2022
US	2013195806	A1	01 August 2013	AU 2012340020	A1 03 July 2014
				AU 2017225146	A1 05 October 2017
				AU 2019201201	A1 14 March 2019
				AU 2021204719	A1 05 August 2021
				CA 2855941	A1 23 May 2013
				CA 3178098	A1 23 May 2013
				CN 104080464	A 01 October 2014
				CN 113786417	A 14 December 2021
				CY 1121819	T1 31 July 2020
				DK 2780022	T3 15 July 2019
				EP 2780022	A1 24 September 2014
				EP 3563860	A1 06 November 2019
				ES 2734453	T3 10 December 2019
				FI 2780022	T4 06 July 2023
				GB 2496969	A 29 May 2013
				HK 1202456	A1 02 October 2015
				HR P20191110	T1 20 September 2019
				HU E044778	T2 28 November 2019
				IL 273107	A 30 April 2020
				IL 287381	A 01 December 2021
				IL 308205	A 01 January 2024
				JP 6506023	B2 24 April 2019
				JP 6563996	B2 21 August 2019
				JP 6899865	B2 07 July 2021
				JP 7081016	B2 06 June 2022
				JP 7404441	B2 25 December 2023
				JP 2014533289	A 11 December 2014
				JP 2018048144	A 29 March 2018
				JP 2019189614	A 31 October 2019

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/EP2024/060741</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2021113193 A	05 August 2021
		JP 2022130370 A	06 September 2022
		JP 2024037864 A	19 March 2024
		KR 20140096368 A	05 August 2014
		LT 2780022 T	10 July 2019
		PL 2780022 T3	29 November 2019
		PT 2780022 T	16 July 2019
		SI 2780022 T1	30 September 2019
		TW 201333200 A	16 August 2013
		TW 201828960 A	16 August 2018
		TW 202120107 A	01 June 2021
		TW 202317157 A	01 May 2023
		US 2013195806 A1	01 August 2013
		US 2015366915 A1	24 December 2015
		US 2020405767 A1	31 December 2020
		WO 2013074681 A1	23 May 2013

---

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/EP2024/060741

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b>		
INV. A61K38/17	A61K9/00	A61K48/00
C12N15/85	A61K39/395	A61K45/06
ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K A61P C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2019/229116 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV PARIS DESCARTES [FR] ET AL.) 5 décembre 2019 (2019-12-05) cité dans la demande page 2, lignes 20-22; revendications 1,3,8,9 -----	1-3,5,6, 18
X	US 2013/045926 A1 (DEVORE DALE P [US] ET AL) 21 février 2013 (2013-02-21) cité dans la demande alinéa [0006]; revendications; exemples -----	1-3,5,6
X	FR 3 111 913 A1 (EYEVENSYS [FR]) 31 décembre 2021 (2021-12-31) le document en entier -----	7-18
	- / - -	
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/>
	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
2 juillet 2024	12/07/2024	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  <b>Durrenberger, Anne</b>	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>BEHAR-COEN FRANCINE ET AL: "Decorin for choroidal neovascularization fibrosis and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium", ANNU MEET ASSOC RES VIS OPHTHALMOL (ARVO), 1 mai 2022 (2022-05-01), XP093102989, Extrait de l'Internet: URL:https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2781357 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-18
Y	<p>XIE XINYI ET AL: "Decorin Protects Retinal Pigment Epithelium Cells from Oxidative Stress and Apoptosis via AMPK-mTOR-Regulated Autophagy", OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY, vol. 2022, 29 mars 2022 (2022-03-29), pages 1-17, XP093101036, US, ISSN: 1942-0900, DOI: 10.1155/2022/3955748 Extrait de l'Internet: URL:http://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2022/3955748.xml cité dans la demande le document en entier</p> <p>-----</p>	1-18
Y	<p>WANG SHUAI ET AL: "Decorin Prevents Retinal Pigment Epithelial Barrier Breakdown Under Diabetic Conditions by Suppressing p38 MAPK Activation", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY &amp; VISUAL SCIENCE, vol. 56, no. 5, 8 mai 2015 (2015-05-08), page 2971, XP093101466, US, ISSN: 1552-5783, DOI: 10.1167/iovs.14-15874 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-18
Y	<p>US 2013/195806 A1 (GAY ROGER [US] ET AL) 1 août 2013 (2013-08-01) revendications 1,30, 209</p> <p>-----</p>	4
Y,P	<p>BIGTO KARINE ET AL: "Efficacy and durability of EYS809 non-viral gene therapy in nAMD preclinical models", ARVO ANNUAL MEETING 2023, 1 juin 2023 (2023-06-01), pages 1-2, XP093181079, Extrait de l'Internet: URL:https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2786515&gt; le document en entier</p> <p>-----</p>	1-18

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2024/060741

### Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
  - a.  faisant partie de la demande internationale telle que déposée.
  - b.  remis postérieurement à la date de dépôt international aux fins de la recherche internationale (règle 13<sup>ter</sup>.1.a),  
 accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée.
2.  En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le présent rapport a été établi dans la mesure où une recherche valable pouvait être effectuée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.
3. Commentaire complémentaires:

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2024/060741

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2019229116	A1	05-12-2019	AUCUN	
-----				
US 2013045926	A1	21-02-2013	AU 2010325908 A1	07-06-2012
			BR 112012013303 A2	01-03-2016
			CA 2781309 A1	09-06-2011
			CN 102639141 A	15-08-2012
			EA 201290442 A1	30-11-2012
			EP 2506862 A1	10-10-2012
			JP 2013512924 A	18-04-2013
			KR 20120114282 A	16-10-2012
			US 2013045926 A1	21-02-2013
			WO 2011069046 A1	09-06-2011
-----				
FR 3111913	A1	31-12-2021	AU 2021298865 A1	02-02-2023
			CA 3182197 A1	06-01-2022
			CN 115768486 A	07-03-2023
			EP 4171636 A1	03-05-2023
			FR 3111913 A1	31-12-2021
			IL 299487 A	01-02-2023
			JP 2023531289 A	21-07-2023
			KR 20230028509 A	28-02-2023
			US 2024189448 A1	13-06-2024
			WO 2022003063 A1	06-01-2022
-----				
US 2013195806	A1	01-08-2013	AU 2012340020 A1	03-07-2014
			AU 2017225146 A1	05-10-2017
			AU 2019201201 A1	14-03-2019
			AU 2021204719 A1	05-08-2021
			CA 2855941 A1	23-05-2013
			CA 3178098 A1	23-05-2013
			CN 104080464 A	01-10-2014
			CN 113786417 A	14-12-2021
			CY 1121819 T1	31-07-2020
			DK 2780022 T3	15-07-2019
			EP 2780022 A1	24-09-2014
			EP 3563860 A1	06-11-2019
			ES 2734453 T3	10-12-2019
			FI 2780022 T4	06-07-2023
			GB 2496969 A	29-05-2013
			HK 1202456 A1	02-10-2015
			HR P20191110 T1	20-09-2019
			HU E044778 T2	28-11-2019
			IL 273107 A	30-04-2020
			IL 287381 A	01-12-2021
			IL 308205 A	01-01-2024
			JP 6506023 B2	24-04-2019
			JP 6563996 B2	21-08-2019
			JP 6899865 B2	07-07-2021
			JP 7081016 B2	06-06-2022
			JP 7404441 B2	25-12-2023
			JP 2014533289 A	11-12-2014
			JP 2018048144 A	29-03-2018
			JP 2019189614 A	31-10-2019
			JP 2021113193 A	05-08-2021
			JP 2022130370 A	06-09-2022
			JP 2024037864 A	19-03-2024
			KR 20140096368 A	05-08-2014
			LT 2780022 T	10-07-2019

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2024/060741

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		PL 2780022 T3	29-11-2019
		PT 2780022 T	16-07-2019
		SI 2780022 T1	30-09-2019
		TW 201333200 A	16-08-2013
		TW 201828960 A	16-08-2018
		TW 202120107 A	01-06-2021
		TW 202317157 A	01-05-2023
		US 2013195806 A1	01-08-2013
		US 2015366915 A1	24-12-2015
		US 2020405767 A1	31-12-2020
		WO 2013074681 A1	23-05-2013

---