

(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
15 mars 2012 (15.03.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/032497 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 9/127 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

CISA-INIA, Carretera de Algete a El Casar km 8.1, Valdeolmos, E-28130 Madrid (ES).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/IB2011/053956

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 Rue De Saint Petersbourg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :

9 septembre 2011 (09.09.2011)

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1003622 10 septembre 2010 (10.09.2010) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD) [FR/FR]; 42, rue Scheffer, F-75016 Paris (FR). INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA) [ES/ES]; Ctra. de La Coruna, km 7,5, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MCKEY, Michael [FR/FR]; 308 avenue de Fes, Résidence Primavera, 105A, F-34080 Montpellier (FR). DEDIEU, Laurence [FR/FR]; 23 rue Raimu, F-34070 Montpellier (FR). TAFALLA, Carolina [ES/ES]; CISA-INIA, Carretera de Algete a El Casar km 8.1, Valdeolmos, E-28130 Madrid (ES). CUESTA, Alberto [ES/ES];

Publiée :

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

(54) Titre : NOVEL GENE VACCINATION LIPOSOMES

(54) Titre : NOUVEAUX LIPOSOMES DE VACCINATION GÉNÉRIQUE

(57) Abstract : The present invention relates to liposomes composed of DOPE and/or of a variant of DOPE bearing at least one ligand for targeting dendritic cells, of DOTAP and/or of a variant of DOTAP bearing at least one ligand for targeting dendritic cells and of cardiolipin and/or of a variant of cardiolipin bearing at least one ligand for targeting dendritic cells; and to the use thereof as a genetic material carrier for preparing lipoplexes. The lipoplexes according to the invention are advantageous because of the limited cytotoxicity thereof *in vivo*; they are therefore of particular interest for gene vaccination; in a form encapsulated in a biodegradable and nonimmunogenic cell such as an alginate gel, they are particularly suitable in particular for oral vaccination of aquatic animals.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à des liposomes composés de DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques, de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques et de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques; à leur utilisation comme support de matériel génétique pour la préparation lipoplexes. Les lipoplexes selon l'invention sont avantageux par leur cytotoxicité limitée *in vivo*; ils présentent donc un intérêt particulier pour la vaccination générique; sous forme encapsulée dans un gel biodégradable et non immunogène tel qu'un gel d'alginate, ils sont particulièrement adaptés, en particulier, pour la vaccination par voie orale d'animaux aquatiques.



WO 2012/032497 A1

NOUVEAUX LIPOSOMES DE VACCINATION GENIQUE

La présente invention se rapporte à de nouveaux liposomes utiles pour transférer des cellules *in vitro* et *in vivo*, et en particulier comme supports de vaccination génique ; ces liposomes, associés à du matériel génétique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène, et encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène, tel qu'un gel d'alginate, sont particulièrement adaptés à la vaccination par la voie orale d'animaux d'élevage, en particulier, d'animaux aquatiques.

La vaccination génique (ou génétique) est une vaccination à base d'ADN ou d'ARN "nu" ; elle consiste à administrer à un organisme animal ou humain une partie du matériel génétique de l'agent pathogène contre lequel on recherche l'immunisation.

Plus précisément, le matériel génétique correspond à un vecteur d'expression comprenant un fragment d'ADN (ou à la séquence ARN correspondante) codant pour une protéine antigénique capable de déclencher une réaction immunitaire protectrice. L'ADN du pathogène s'exprime alors dans le noyau des cellules de l'hôte à vacciner ; lorsqu'il s'agit d'ARN, il s'exprime dans le cytoplasme desdites cellules ; il y a production d'antigène ; celui-ci est présenté au système immunitaire et déclenche une réponse.

Lorsque l'agent pathogène est un virus, l'antigène viral provoque une double réponse immunitaire : humorale (production d'anticorps capables, lors d'une infection, de reconnaître spécifiquement cet antigène sur le virus) et cellulaire (incluant l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dont le rôle est de détruire les cellules infectées par le virus).

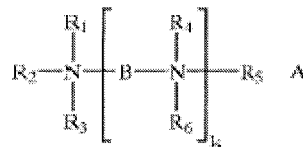
Cette technique présente l'avantage de permettre de vacciner contre toutes les maladies infectieuses.

Chez l'animal, les vaccins à ADN ont donné des résultats probants pour un grand nombre de maladies, notamment la grippe chez les primates, le paludisme, le VIH chez la souris.

Les Brevets Américains US 5,780,448 et US 6,180,614 décrivent des vaccins géniques adaptés pour la vaccination de poissons constitués d'oligonucléotides d'ADN codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène (virus, bactérie ou parasite) et de liposomes ; ces liposomes sont, par exemple, constitués de lipides neutres tels que du DOPE (L- α -dioleoyl phosphatidyléthanolamine, 1,2-

dioléoyloxyphosphatidyléthanolamine ou 1,2-dioléoylphosphatidyléthanolamine) ou du cholestérol et d'un lipide cationique.

Le Brevet Américain US 6,733,777 propose des liposomes cationiques adaptés à la délivrance de composés dans des cellules *in vitro* ou *in vivo*. Ces liposomes
 5 comprennent un lipide neutre tel que du DOPE, du cholestérol ou de la dioléoylphosphatidylcholine (DPOC) et une ou plusieurs cytoflectines cationiques de formule (I) :



Ces liposomes sont notamment adaptés comme support d'ADN pour
 10 transférer des cellules *in vivo*.

Romoren *et al.* ont cependant décrit que certains de ces liposomes, en particulier, les liposomes composés de DOPE et de DOTAP à un ratio massique 1:1, utilisées pour la vaccination génique de poissons pouvaient présenter un effet toxique sur les poissons en les asphyxiant par fixation aux branchies (J. Controlled Release (2002)
 15 85:203-213).

Dans des travaux ultérieurs, Romoren *et al.* ont également décrit la préparation de plusieurs liposomes cationiques pour l'administration de vaccin à des poissons ; ces liposomes sont composés de DOPE : DOTAP avec un ratio pondéral de 1:1, DOPE : DOTAP avec un ratio pondéral 3:1, DSPC (distearoyl phosphatidylcholine) ou
 20 DSPC : DSPG (DSPG, distearoyl phosphatidylglycerol) avec un ratio pondéral de 9:1 (Biochimica & Biophysica Acta. (2005) Vol.1717, n°1, p.50-57) ; là encore, ces travaux indiquent que l'association de DOPE et de DOTAP est toxique.

Enfin, Thierry *et al.* décrivent la préparation de liposomes anioniques composés de DOGS (spermine-5-carboxy-glycinediotadecyclamide) : DOPE : cardiolipine avec un ratio pondéral de 1:1:0,5 ; le but de ces auteurs
 25 est de réaliser une étude structurelle des lipoplexes fabriqués à partir de tels liposomes en fonction de la nature des acides nucléiques qui leur sont associés ; la capacité de ces lipoplexes à transférer des cellules n'est pas testée (Biochimica & Biophysica Acta. (2009) Vol.1790, n°5, p.385-394).

Il demeure donc le besoin de préparer des supports de vaccination génique conduisant à une réaction immunitaire efficace tout en préservant une bonne innocuité de la formulation.

C'est ce à quoi est parvenue la Demanderesse en mettant au point de nouveaux liposomes composés :

- de DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques,

- de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques et

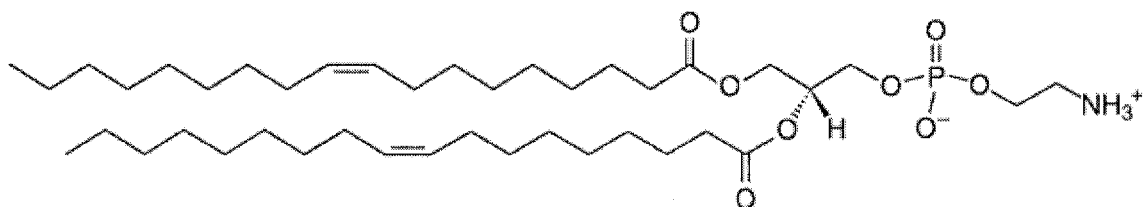
- de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques.

Par ligand pour le ciblage de cellules dendritiques, on entend des composés qui se fixent sur les récepteurs de cellules dendritiques tels que, par exemple, la biotine, des oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément (notamment C3, C5...), des immunoglobulines ou leur fraction cristallisable (Fc)...

Selon une variante préférée, les liposomes selon l'invention sont composés du DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques, de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques et de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques à l'exclusion de tout autre composé.

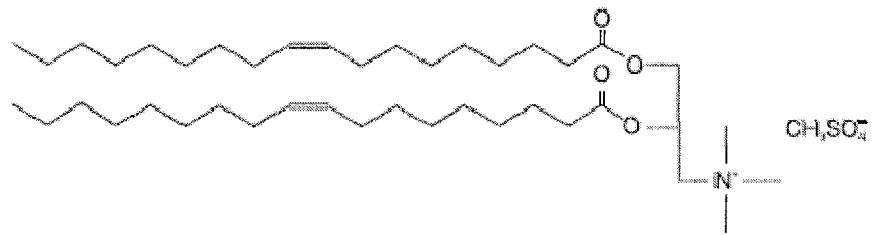
Ces nouveaux liposomes sont particulièrement utiles comme support de matériel génétique.

Le DOPE est un lipide neutre de structure chimique :



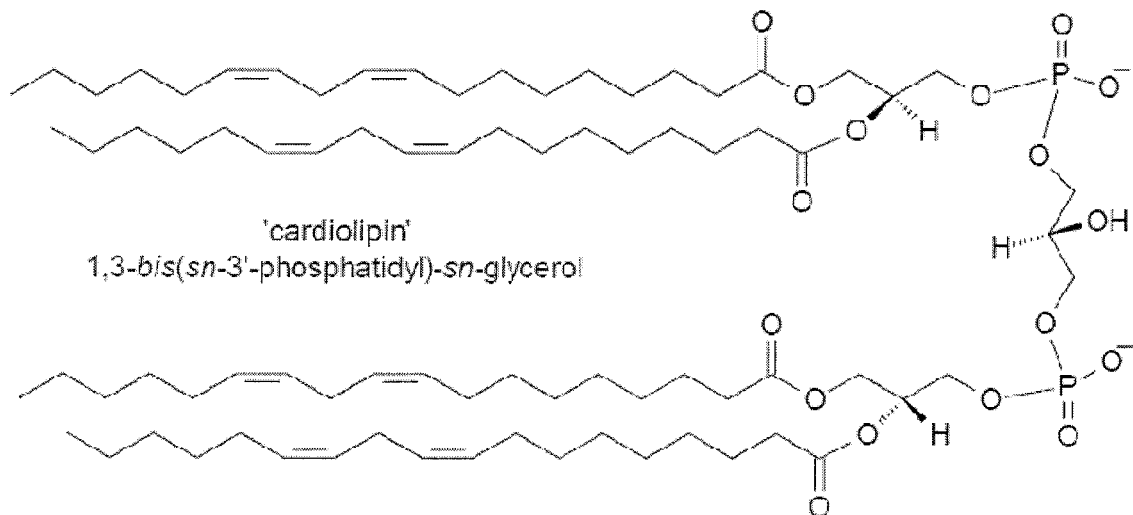
La teneur en DOPE ou en variant du DOPE dans les liposomes selon l'invention est comprise entre 10 et 50% en poids par rapport au poids total de liposomes.

Le DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate) est un lipide cationique de structure chimique :



La teneur en DOTAP ou en variant du DOTAP dans les liposomes selon l'invention est comprise entre 10 et 50% en poids par rapport au poids total de liposomes.

La cardiolipine (glycérol bisphosphatidyle) est un lipide anionique qui représente 18% des molécules de la membrane interne de la mitochondrie et qui est responsable de la forte imperméabilité de la membrane interne aux protons.



La teneur en cardiolipine ou en variant de la cardiolipine dans les liposomes selon l'invention est comprise entre 5 et 30% en poids par rapport au poids total de liposomes.

Selon une variante préférée de l'invention, les trois lipides sont présents dans un ratio DOPE et/ou de son variant : DOTAP et/ou de son variant : cardiolipine et/ou de son variant de 1:1:0,5 en poids.

Les liposomes selon l'invention sont préparés selon les techniques connues de l'homme du métier.

Une telle technique peut par exemple comprendre les étapes suivantes :

- mise en suspension de chacun des lipides dans un solvant polaire tel que l'éthanol à raison de 20 mg de lipides/ml ;

- mélange des lipides neutre et cationique (DOPE et DOTAP) en solution ;

- formation d'un film lipidique par évaporation du ou des solvants par séchage sous vide d'air (avec, par exemple, un évaporateur Speedvac®) et/ou par chauffage sous rotation (en utilisant, par exemple, comme matériel le rotavap) à 55-60°C sur la nuit ;

5 - dilution du film lipidique par ajout du lipide anionique (cardiolipine) solubilisé dans l'éthanol ;

- formation des liposomes par ajout d'eau ;

- optionnellement, l'extrusion de la suspension est réalisée sur membrane-filtre de polycarbonate (présentant par exemple des pores de 100 nm de diamètre) à l'aide d'un extrudeur discontinu (par exemple : « LiposoFast » d'Avanti Polar) ou continu haute-pression (par exemple : « Maximator HPE 12.0-100 », de Dispex) ;

10 - dilution des liposomes dans une solution à pH acide (par exemple à pH~5) lors de l'étape de formation des complexes ; il est possible d'utiliser d'autres solutions aqueuses isotoniques tampons comme le tampon MES (acide 2-morpholino éthanesulfonique monohydraté), le tampon MOPS (acide N-morpholino-3-propane sulfonique), le tampon Tris (trishydroxyméthylaminométhane), etc... lors de cette étape.

Ces liposomes sont utiles comme support de matériel génétique pour la transfection de cellules *in vitro* ou *in vivo*.

20 Par support de matériel génétique, il est entendu que les liposomes selon l'invention sont avantageusement associés à du matériel génétique et permettent l'administration dudit matériel à des cellules *in vitro* ou *in vivo*.

Par matériel génétique, on entend des acides nucléiques, synthétiques ou naturels, simple ou double brins, tels que l'ADN génomique, l'ADNc, des plasmides, des oligonucléotides, l'ARN, notamment l'ARNm sens ou antisens ou des ARN interférents.

25 Ces liposomes sont particulièrement efficaces pour délivrer du matériel génétique dans les cellules ; c'est-à-dire transfecter des cellules *in vitro* ou *in vivo*, ce qui consiste à introduire ledit matériel génétique dans le cytoplasme et/ou le noyau et/ou les organelles cellulaires des cellules ; ils trouvent une application particulière comme support de vaccination génique.

30 Ainsi les liposomes selon l'invention sont avantageusement utilisés comme support de matériel génétique pour vaccination génique, car l'effet cytotoxique est limité.

Lorsqu'ils sont utilisés à des fins vaccinales, les liposomes selon l'invention sont associés à du matériel génétique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène contre lequel on veut vacciner un individu. L'expression par les cellules de l'individu de ce polypeptide antigénique provoque une réaction immunitaire qui
5 permettra la reconnaissance dudit agent pathogène par le système immunitaire dudit individu en cas d'infection ultérieure par ledit agent pathogène.

Selon un autre de ses objets, la présente invention se rapporte à des lipoplexes comprenant un liposome selon l'invention et du matériel génétique permettant l'expression d'un polypeptide antigénique d'un agent pathogène et conduisant à une
10 vaccination par l'induction d'une réponse immunitaire contre ledit agent pathogène.

Les agents pathogènes sont notamment des virus, des bactéries, des levures, des champignons ou des parasites.

Le matériel génétique codant pour le polypeptide antigénique se présente sous la forme d'un vecteur d'expression comprenant une séquence de contrôle de l'expression adaptée à l'individu à vacciner, et au moins un fragment nucléotidique codant
15 pour ledit polypeptide antigénique.

En particulier, le vecteur d'expression est un plasmide dans lequel est introduit une séquence codante tel que le plasmide pMCV1.4 (Ready Vector, Madrid, Espagne; *Cuesta and Tafalla, Vaccine, 2009, 27:280-289.*) représenté à la Figure 1 et de séquence nucléotidique SEQ. ID. N°1 ou le plasmide pcDNA3.1 d'Invitrogen représenté à
20 la Figure 2 et de séquence nucléotidique SEQ. ID. N°2.

Le fragment nucléotidique codant pour le polypeptide antigénique est choisi selon l'agent pathogène contre lequel on veut obtenir une immunisation.

La préparation du vecteur d'expression est réalisée selon les méthodes
25 classiques de l'homme du métier; à titre d'exemple et quel que soit le fragment nucléotidique à cloner dans le vecteur d'expression, ce dernier peut être préparé en utilisant la méthode décrite dans *Cuesta and Tafalla, Vaccine, 2009, 27: 280-289* qui s'applique à l'introduction du gène G du virus de la septicémie hémorragique virale (VHSH) ou la méthode décrite dans *Cuesta et al., Vaccine, 28 (2010) 3291-3300* qui s'applique à
30 l'introduction du gène VP1 du virus de nécrose hématopoïétique infectieuse (IPNV).

L'utilisation des lipoplexes selon l'invention s'avère particulièrement utile et efficace pour la vaccination à grande échelle d'animaux d'élevage; en effet, cette forme de vaccin peut notamment être administrée par la voie orale, évitant ainsi l'injection

qui demande une manipulation des animaux par un spécialiste et qui est traumatisante pour les animaux.

On entend par animaux d'élevage, les animaux de pacage tels que les bovins, les ovins, les caprins, les porcins, les équidés, les camélidés et les cervidés ; les animaux de basse-cour, tels que les lapins et les oiseaux ; les animaux aquatiques, l'aquaculture comprenant la pisciculture, la conchyliculture et l'élevage de crustacés et enfin, les animaux de compagnie.

Selon un mode réalisation particulier de l'invention, les lipoplexes sont encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène tel qu'un gel d'alginate ; ils présentent alors un intérêt particulier pour la vaccination orale d'animaux aquatiques car ledit gel évite la dilution du principe actif dans l'eau. Les animaux aquatiques sont en particulier des poissons marins tels que bar, dorade, saumon, thon, turbot etc., des poissons d'étang tels que carpe, brochet, gardon, esturgeon etc, et des poissons d'eau douce tels que silure, truite etc.

Les peptides antigéniques d'agents pathogènes utilisables pour la vaccination d'animaux aquatiques sont :

- lorsque les agents pathogènes sont des virus, par exemple : les glycoprotéines (G) du virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV) ; du virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV) ; les protéines structurales VP1 ou VP2 du virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV) ; la protéine G du virus de la virémie printanière de la carpe (SVC) et des glycoprotéines ou des protéines associées aux membranes, téguments ou capsides du virus du poisson chat (CCV) ;

- lorsque les agents pathogènes sont des bactéries, par exemple : les protéines membranaires externes de régulation du fer (IROMP pour iron-regulated outer membrane protein) ; les protéines A de *Aeromonas salmonicida* qui provoque des furoncles ; la protéine p57 de *Renibacterium salmoninarum* qui provoque la maladie bactérienne du rein (BKD), les antigènes Eta6 et FliC de *Edwardsiella tarda* ;

- lorsque les agents pathogènes sont des parasites, par exemple : les antigènes de surface d'*Ichthyophthirius*.

La préparation du lipoplexe de vaccination génique selon l'invention est réalisée par mélange d'une solution de liposomes selon l'invention avec les vecteurs d'expression. L'étape de complexation se fait par ajout d'une solution à un pH neutre ou proche de la neutralité ($6,5 < \text{pH} < 8$) contenant le vecteur d'expression d'intérêt, à la

suspension de liposomes vides préalablement dilués dans une solution aqueuse isotonique à pH acide (pH~5). Le ratio utilisé de la variante préférée DOPE/DOTAP/cardioline (1:1:0,5, m/m/m) est de 25 µl de liposomes à 6,25 mg/ml pour 20 µg de vecteur d'expression d'ADN, soit un ratio massique ADN/lipides de 20/156,25, soit 0,128 mais ce
5 ratio massique ADN/lipide peut plus largement être compris entre 0,01 et 0,5.

Les lipoplexes selon l'invention peuvent être administrés par la voie orale, par immersion d'une solution comprenant lesdits lipoplexes pour les animaux aquatiques, ou par les voies aériennes (spray nasal ou pulmonaire), ou encore par injection intramusculaire, intraveineuse ou intradermique. Dans le cas des poisons, l'administration
10 par immersion ou par mélange avec les granulés alimentaires permet de délivrer les lipoplexes sans aucun stress pour les animaux.

L'homme du métier adaptera la quantité de lipoplexes à administrer selon l'animal visé et l'agent pathogène.

Comme indiqué plus tôt, selon une forme particulière de l'invention, les
15 lipoplexes sont encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène tel qu'un gel d'alginate, afin de former une formulation galénique en vue de leur administration par voie orale à des animaux d'élevage.

Les alginates sont des polysaccharides biodégradables et non-immunogènes obtenus à partir d'une famille d'algues brunes, les laminaires ; il s'agit plus
20 particulièrement d'un polymère formé de deux monomères liés ensemble : le mannuronate ou acide mannuronique et le guluronate ou acide guluronique. D'autres gels biodégradables et non immunogènes peuvent être utilisés, il s'agit par exemple d'autres polysaccharides aux propriétés gélifiantes tels que, notamment les carraghénanes (galactanes).

Pour préparer les formulations galéniques selon l'invention, une solution aqueuse au pH neutre et dépourvue de cations divalents contenant de l'alginate de sodium (alginate de grade pharmaceutique à faible viscosité) à une concentration comprise entre 2 et 10% est préparée ; elle est ensuite mélangée aux lipoplexes selon l'invention. L'ajout se
25 fait en suspension, volume à volume pour une solution d'alginate à 3%.

Le mélange est placé dans une seringue avec une aiguille d'un diamètre compris entre 0,10 et 0,40 mm et est extrudé goutte-à-goutte dans une solution de cations divalents (Ca^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} etc) ou trivalent (Al^{3+}) afin de permettre la gélification de la
30 formulation.

Les formulations galéniques sont donc composées de sphères gélifiées incorporant les liposomes vaccinaux ; ces sphères ont un diamètre compris entre 1 à 3 mm selon le diamètre de l'aiguille utilisée.

L'encapsulation à base de gel biodégradable et non immunogène présente l'avantage de protéger les liposomes vaccinaux, d'obtenir une formulation globulaire plus attractive pour les poissons, d'améliorer l'adhésion des formulations aux muqueuses et d'augmenter la demi-vie de la formulation.

Comme l'illustre l'exemple 2, cette formulation galénique s'avère particulièrement adaptée pour la vaccination par voie orale de poissons d'élevage.

Ainsi les lipoplexes et les formulations galéniques selon l'invention présentent un intérêt pour leur utilisation en tant que médicament, en particulier, en tant que vaccin.

La présente invention se rapporte également à un lipoplexe ou à une formulation galénique selon l'invention pour leur utilisation pour la vaccination d'animaux d'élevage contre des agents pathogènes choisis parmi les virus comme les rhabdovirus tels que le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV), le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV), le virus de la virémie printanière de la carpe (SVC), les herpesvirus tels que le virus du poisson chat (CCV) ; les parasites tels que les Ichthyophthirius ; les bactéries comme *Aeromonas salmonicida* qui provoque des furoncles, *Renibacterium salmoninarum*, *Edwardsiella tarda* ; les levures et les champignons. De façon préférée, la présente invention se rapporte à une formulation galénique selon l'invention pour la vaccination orale de poissons d'élevage ; de préférence, ladite utilisation est particulièrement adaptée à la vaccination orale de poissons d'élevage contre les rhabdovirus, en particulier, contre le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV).

La présente invention se rapporte encore à une méthode de vaccination d'animaux d'élevage comprenant une étape d'administration des lipoplexes ou des formulations galéniques selon l'invention.

Figures

Les **Figures 1** et **2** sont des représentations schématiques des plasmides respectivement pMCV1.4 et pcDNA3.1.

La **Figure 3** représente schématiquement le procédé mis en œuvre pour préparer les liposomes FELIA selon l'exemple 1.

La **Figure 4** est un histogramme représentant l'expression, dans divers organes, de plusieurs protéines clés de la réponse immunitaire (Mx, IFN2, IFN γ , NKEF, CMH I, CMH Ia, CMH II, CMH IIa, IL1 β , IgM et CD8) ; les barres représentent les ratios d'expression génique entre le groupe vacciné et (pG-FELIA) et le groupe contrôle (cFELIA).

La **Figure 5** représente la détection par PCR de l'expression du gène G du VHSV au niveau du tube digestif des truites après immunisation orale par les formulations galéniques selon l'invention, dénommées pG-FELIA (F). M représente le marqueur de poids moléculaire et N, le contrôle négatif.

La **Figure 6** est la mesure, par ELISA, des anticorps anti-G-VHSV dans le sérum des truites 1 (1m) et 2 mois (2m) après délivrance orale de FELIA de contrôle (groupe cFELIA, lipoplexes contenant des plasmides d'expression vides puis encapsulé dans un gel) et de FELIA contenant le gène G du VHSV (pG-FELIA). Les barres représentent les densités optiques mesurées pour chaque truite du groupe contrôle (cFELIA) et du groupe vaccinés (pG-FELIA). Le contrôle positif C+ représente les résultats obtenus avec le sérum d'un poisson ayant survécu à une infection par le VHSV.

Les **Figures 7.1 à 7.10** représentent la mesure par PCR en temps réel de l'expression de gènes de la réponse immunitaire (respectivement Mx, CMH I, CD4, NKEF, IFN γ , CMH II, CD8, IFN, IgM et IgT) dans le système digestif (Gut) et dans la rate (Spleen) des truites à différents temps (7, 15, 30, 60 et 120 jours) après immunisation. Les barres représentent les ratios d'expression génique entre le groupe vacciné et (pG-FELIA) et le groupe contrôle (cFELIA). Les données sont calculées pour des pools de 4 animaux.

L'invention est maintenant décrite plus en détail au regard des exemples qui suivent. Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 – Procédé de préparation des liposomes selon l'invention

1. Préparation des liposomes

Chacun des deux lipides DOTAP et DOPE est préalablement solubilisé dans l'éthanol à raison de 20 mg de lipides/ml; ils sont ensuite mélangés dans un ratio 1:1.

Après une étape d'évaporation du solvant, le film lipidique obtenu est redissout par ajout d'une solution de cardiolipine dans de l'éthanol (à raison de 20 mg de

lipides/ml) afin d'obtenir un ratio massique lipidique final DOPE:DOTAP:cardiolipine de 1:1:0,5.

2. Préparation des lipoplexes (liposome et matériel génétique)

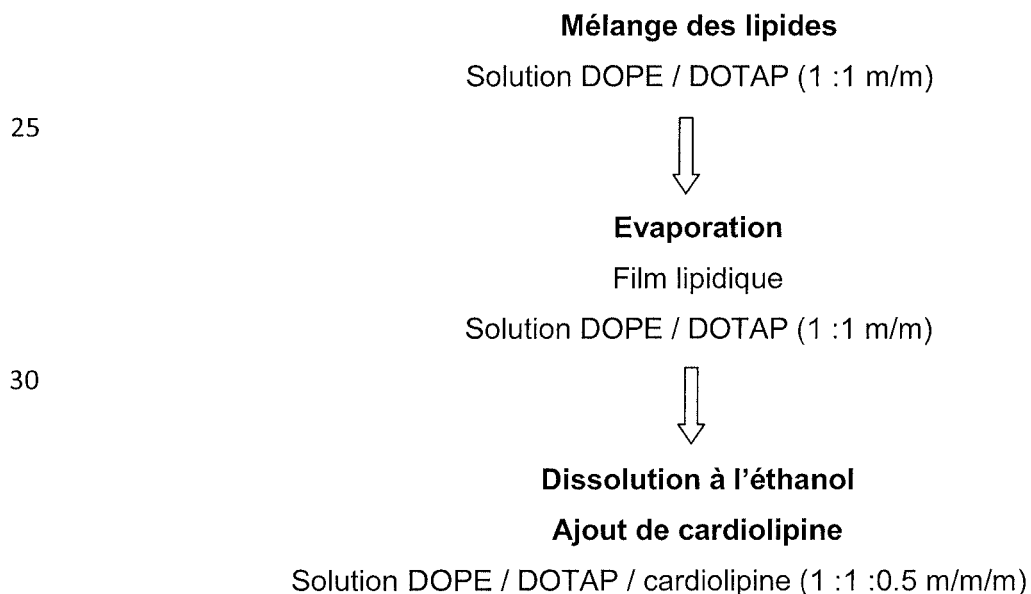
Les lipoplexes sont ensuite préparés par simple injection de la solution plasmidique contenant le gène G du VHSV (pMCMV1.4-G), ou de plasmide vide (pMCMV1.4 ne contenant pas le gène G) comme contrôle, sur les liposomes préalablement dilués dans une solution de NaCl (150 mM, pH 5,4). Le ratio utilisé pour les liposomes DOPE/DOTAP/cardiolipine (1 :1 :0,5, m/m/m) est de 25 µl de liposomes à 6,25 mg/ml pour 20 µg de vecteur d'expression ADN, soit un ratio massique ADN/lipides de 20/156,25, soit 0,128.

3. Préparation de la formulation vaccinale (lipoplexe encapsulé dans un gel d'alginate)

Les lipoplexes sont alors mélangés à de l'alginate de sodium (sodium d'acide alginique, 3%). La solution obtenue subit une étape de sphérification ; pour cela, le mélange est placé dans une seringue montée d'une aiguille de faible diamètre (27G, c'est-à-dire, présentant un diamètre externe d'environ 0,40 mm et une lumière de d'environ 0,20 mm) et extrudé goutte-à-goutte dans une solution de cations divalents (CaCl₂, 100 mM).

Cette étape permet la gélification des gouttes en billes d'alginate contenant les liposomes ayant un diamètre compris entre 1 et 2 mm et dénommées FELIA (Fish Egg-like Liposomes In Alginate).

La mise en œuvre de ce procédé est schématisée ci-dessous et à la Figure 3.





Injection éthanolique

Injection d'une solution de NaCl 150 mM (pH 5.2) sur la solution

5

DOPE / DOTAP / cardiolipine (1 :1 :0.5 m/m/m)

Formation spontanée de liposomes de type SUV



Formation de lipoplexes

Injection de la solution d'acides nucléiques (ADN) sur les liposomes DOPE / DOTAP / cardiolipine (1 :1 :0.5 m/m/m)

10



Mélange lipoplexes / alginate

Mélange lipoplexes / alginate 3% volume/volume

15



Formation des FELIA

Extrusion goutte à goutte et gélification en CaCl₂

20

Exemple 2 – étude *in vivo* de l'évaluation de l'efficacité : induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire par administration d'une formulation vaccinale selon l'invention par voie orale chez les truites

A) Description du matériel et des méthodes

25

L'expérience a été conduite avec des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) de 12 à 15 cm (22-40g). Chaque groupe était composé de 11 truites. Ces animaux ont été nourris en une fois avec un aliment du commerce mélangé soit avec des FELIA vides comme contrôle (cFELIA, sans le plasmide d'expression génique), soit avec des FELIA (pG-FELIA) contenant le plasmide d'expression du gène G du VHSV. Compte tenu de la quantité de nourriture ingérée par chaque poisson et de la concentration en plasmide de chaque particule de FELIA, la quantité de plasmides ingérée est estimée à 10 µg de plasmides. Après 1 à 2 mois d'alimentation normale, les truites ont été soumises à différentes analyses comme décrit ci-après.

30

1. Plusieurs types de tissus ont été prélevés pour étudier la réponse

immunitaire des truites contre le VHSV.

35

Les prélèvements concernaient le tube digestif, les reins, la rate et le sang.

L'ARN total a été extrait en utilisant le Trizol (Invitrogen) selon les conditions du fournisseur. Les échantillons d'ARN ont été traités par de la DNase I pour éliminer toutes traces d'ADN génomique qui pourraient interférer avec la réaction de PCR (Polymerase chain reaction). Pour chaque échantillon, 1 microgramme (μg) d'ARN a été transformé en ADN complémentaire (ADNc) grâce au réactif Superscript III reverse transcriptase de Invitrogen. Dans ce but, les échantillons de 1 μg d'ARN ont été mélangés avec 1 μl d'oligo (dT) 12-18 (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et 1 μl de dinucléotides triphosphate (dNTP) à 10 millimolaire (mM) et incubés à 65°C. Après 5 minutes, 4 μl du tampon « 5x first strand buffer », 1 μl de dithiothréitol (DTT) à 0,1 molaire (M) et 1 μl du réactif « Superscript III reverse transcriptase » ont été ajoutés, mélangés et, le tout incubé pendant 1 heure à 50°C. La réaction a été stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc ainsi obtenu a été dilué au dixième (1/10) dans de l'eau et conservé à moins 20°C.

Les niveaux d'expression de différents gènes clés de la réponse immunitaire ont ensuite été étudiés par PCR en temps réel comme décrit précédemment (*Cuesta and Tafalla, 2008*). Les mesures ont été effectuées sur des pools de 4 animaux. Les résultats sont exprimés par le ratio entre les données obtenus pour les animaux contrôle (cFELIA) et ceux ayant reçus les pG-FELIA.

2. Le sérum a également été récolté pour l'analyse de la réponse anticorps anti-G par la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Dans ce but, le sang a été prélevé au niveau de la veine caudale de 7 truites pour chaque groupe. Après coagulation à température ambiante pendant 1 heure puis incubation 1 nuit à 4°C, le sérum a été récolté. Le protocole ELISA a été adapté de celui décrit par Johansson *et al.* (Johansson T, Einer-Jensen K, Batts W, Ahrens P, Björkblom C, Kurath G, Björklund H, Lorenzen N. *Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. Dis Aquat Organ. 2009, 86(3):213-21*).

3. L'expression de la protéine G du VHSV a été analysée au niveau du tube digestif des truites par réaction de PCR comme décrit dans *Cuesta & Tafalla, 2008*.

B) Résultats obtenus

La **Figure 4** montre l'expression de plusieurs protéines clés dans la réponse immunitaire telles que les interférons gamma ($\text{IFN}\gamma$) et IFN_2 ; la protéine Mx

(induite par les interférons de type I), les molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I, aussi dénommée MHC I, et CMH II, aussi dénommée MHC II), le facteur NKEF, l'interleukine 1 beta (IL-1 β), les anticorps de type IgM (IgM) et le marqueur de surface CD8.

5 Les résultats démontrent que l'immunisation par le gène G du VHSV induit une forte transcription, 1) au niveau du tube digestif, de la molécule Mx et des anticorps IgM ; 2) dans la rate, des molécules CMH-I, CMH-II et du marqueur CD8 et 3) au niveau des reins, de Mx, IFN- γ , NKEF and MHC-II. Ces résultats prouvent que la vaccination des truites par les FELIA contenant le gène G du VHSV stimule une réponse
10 immunitaire cellulaire et moléculaire.

La **Figure 5** montre la détection par PCR du gène codant pour la protéine G au niveau du tube digestif des truites après immunisation par les pG-FELIA (F). Les résultats mettent en évidence l'expression de ce gène G dans les cellules du système digestif des truites des 4 semaines après la vaccination. Cette expression est toujours
15 détectée 8 semaines après immunisation par les pG-FELIA (F).

La **Figure 6** présente les données de la réponse anticorps anti-GVHSV mesurées par ELISA 1 (1m) et 2 mois (2m) après vaccination par les pG-FELIA. Ces données confirment l'expression du gène G observée dans la figure 4 et démontrent l'induction consécutive d'une réponse anticorps spécifique du gène G du VHSV, 2 mois
20 après l'administration par voie orale des particules de pG-FELIA.

Une dernière expérience a été réalisée avec des poissons plus petits (5-7 cm, 4-10 g). Dans ce cas, les FELIA ont été mixés avec les granulés alimentaires pour pouvoir délivrer environ 5 μ g de plasmide pMCV1.4-G par poisson. Le groupe contrôle a reçu une même dose de FELIA contenant le plasmide vide.

25 La réponse immunitaire a été analysée à différents temps par PCR en temps réel dans la rate (Spleen) et le système digestif (Gut). En plus des marqueurs immunitaires décrits précédemment, le marqueur lymphocytaire CD4 et la mesure des immunoglobulines totales (IgT) ont été ajoutés.

Les résultats des Figures 7.1 à 7.10 montrent que l'administration du
30 plasmide portant le gène G du VHSV au sein des FELIA est capable d'induire, à la fois, une réponse immunitaire locale (au niveau du tube digestif) et systémique (mise en évidence au niveau de la rate). Comme précédemment, une réponse anticorps anti-GVHSV est effectivement détectée dans le sérum des poissons (voir le Tableau I).

Temps (jours)	Positives
7	1/5
15	3/5
30	4/5
60	3/5
120	3/5

Tableau I : Etude cinétique de la réponse anticorps anti-G-VHSV

Cette réponse est maximale à 30 jours avec 4 poissons sur 5 présentant une séroconversion. Elle est toujours détectable chez certains poissons, 120 jours post-vaccination.

- 5 Cette expérience démontre que la vaccination des truites avec 5 µg de plasmide G-VHSV est suffisante pour stimuler une réponse immunitaire cellulaire et humorale, spécifique du VHSV.

REVENDEICATIONS

1. Liposome composé :
 - de DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques choisi parmi la biotine, les oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément, les immunoglobulines ou leur fraction cristallisable,
 - de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques choisi parmi la biotine, les oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément, les immunoglobulines ou leur fraction cristallisable et
 - de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques choisi parmi la biotine, les oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément, les immunoglobulines ou leur fraction cristallisable.
2. Liposome selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend entre 10 et 50% de DOPE et/ou de son variant, entre 10 et 50% de DOTAP et/ou de son variant et entre 5 et 30% de cardiolipine et/ou de son variant en poids par rapport au poids total de liposomes.
3. Liposome selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdits lipides sont présents dans un ratio DOPE et/ou de son variant : DOTAP et/ou de son variant : cardiolipine et/ou de son variant de 1:1:0,5 en poids.
4. Utilisation d'un liposome selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 comme support de matériel génétique pour la transfection de cellules *in vitro* ou *in vivo*.
5. Utilisation selon la revendication 4 comme support de matériel génétique de vaccination et de thérapie génique.
6. Lipoplexe de vaccination génique comprenant un liposome selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 associé à du matériel biologique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène.
7. Lipoplexe selon la revendication 6, caractérisé en ce que le matériel biologique est un plasmide dans lequel un fragment d'acide nucléique codant pour ledit polypeptide antigénique est cloné.

8. Lipoplexe selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6 pour une utilisation comme vaccin.

9. Formulation galénique caractérisée en ce qu'elle comprend des lipoplexes selon la revendication 6 ou 7 encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène.

10. Formulation galénique selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit gel biodégradable et non immunogène est un gel d'alginate.

11. Formulation galénique selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit lipoplexe comprend, à titre de matériel génétique, un plasmide comprenant un fragment d'acide nucléique codant pour la protéine G du virus de la septicémie hémorragique.

12. Formulation galénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 pour son utilisation en tant que médicament.

13. Formulation galénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 pour son utilisation pour la vaccination d'animaux d'élevage.

14. Formulation galénique pour son utilisation selon la revendication 13 pour la vaccination de poissons d'élevage contre les rhabdovirus tels que le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV), le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV), le virus de la virémie printanière de la carpe (SVC), les herpesvirus tels que le virus du poisson chat (CCV); les parasites tels que les Ichthyophthirius; les bactéries comme *Aeromonas salmonicida* qui provoque des furoncles, *Renibacterium salmoninarum*, *Edwardsiella tarda*; les levures et les champignons.

15. Formulation galénique pour son utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit rhabdovirus est le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV).

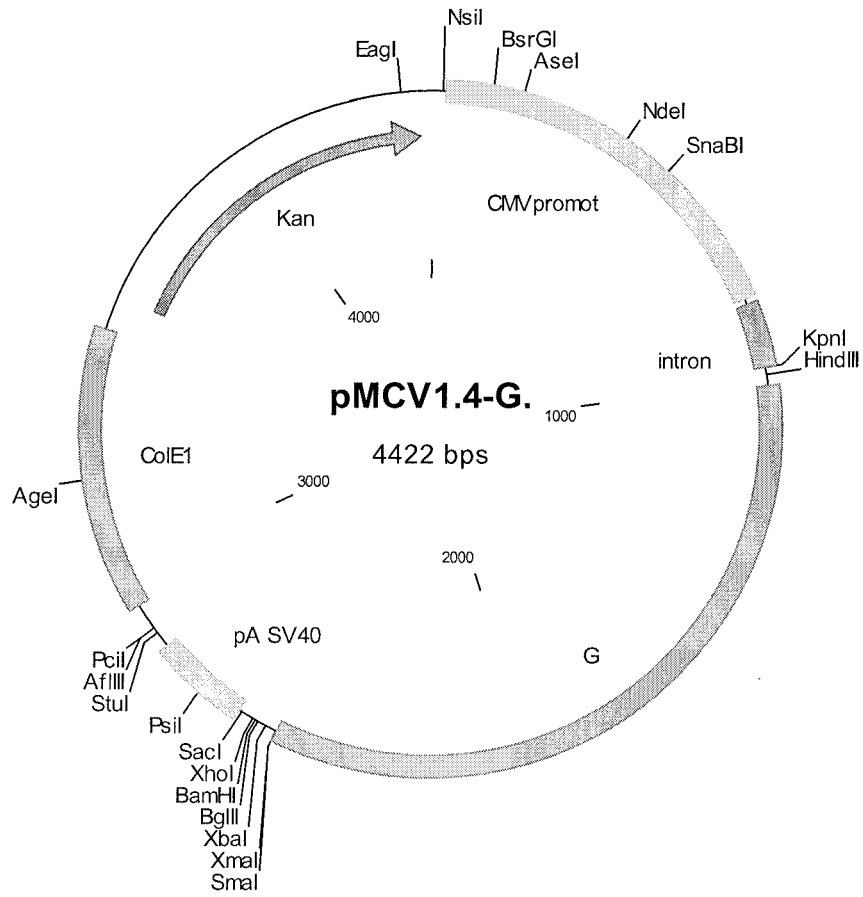


Figure 1

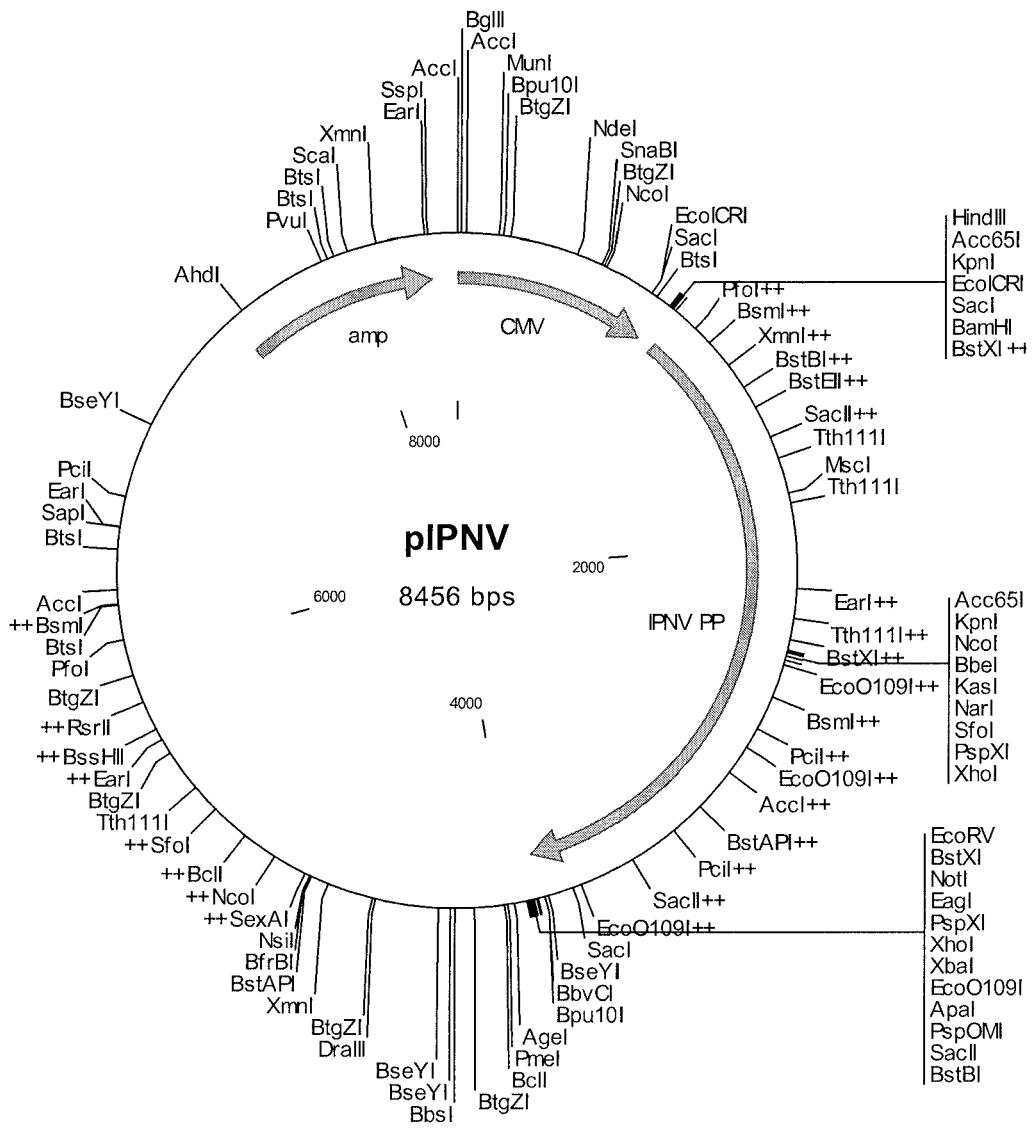


Figure 2

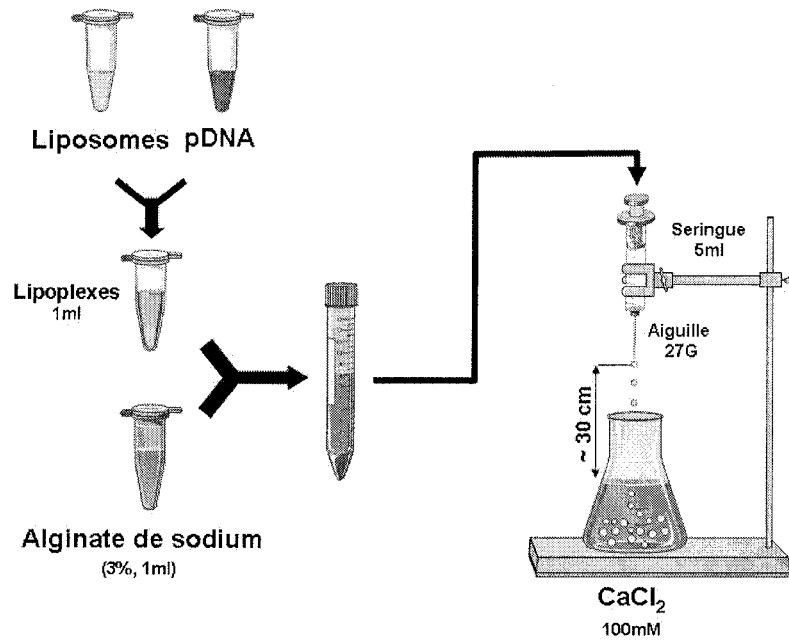


Figure 3

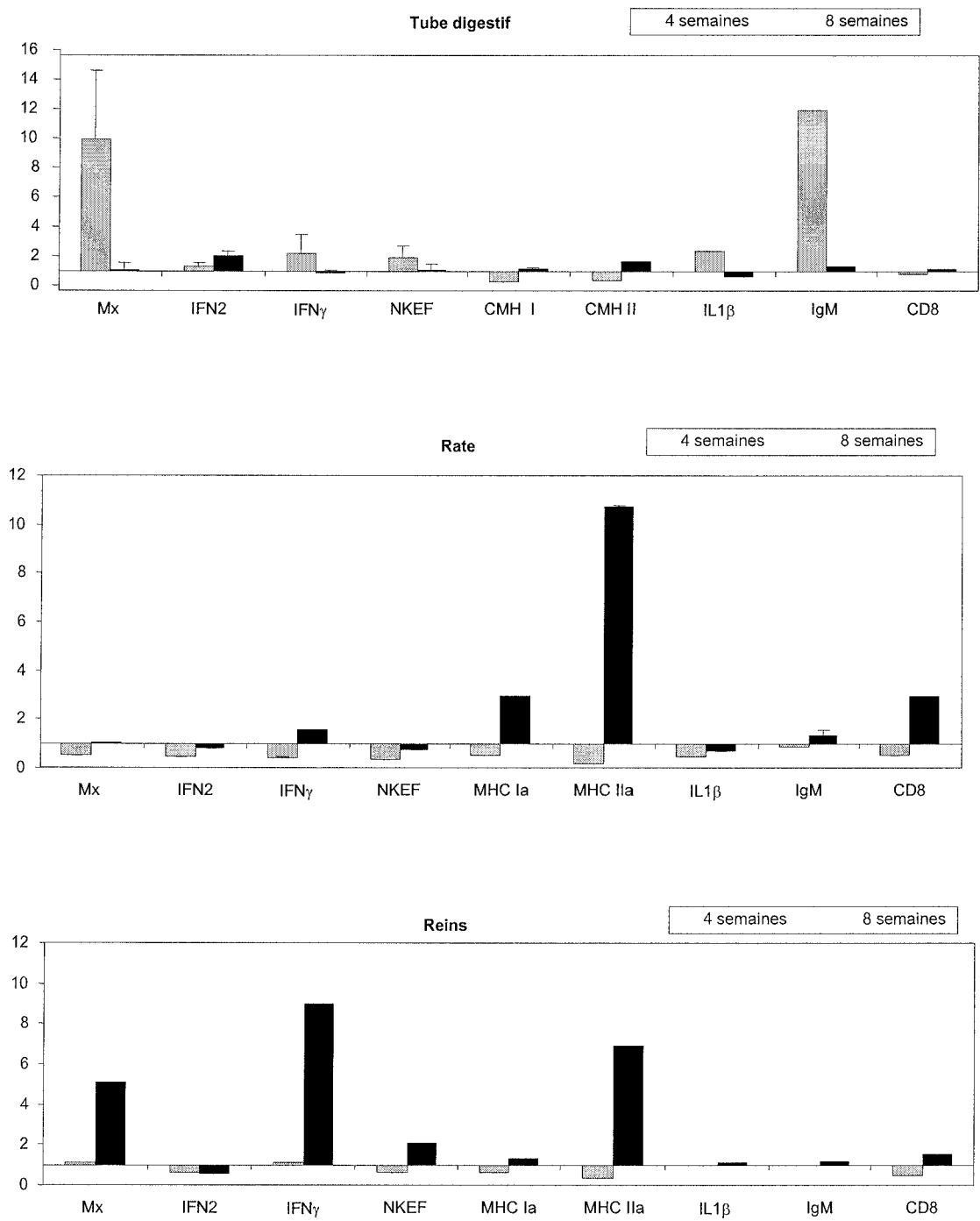


Figure 4

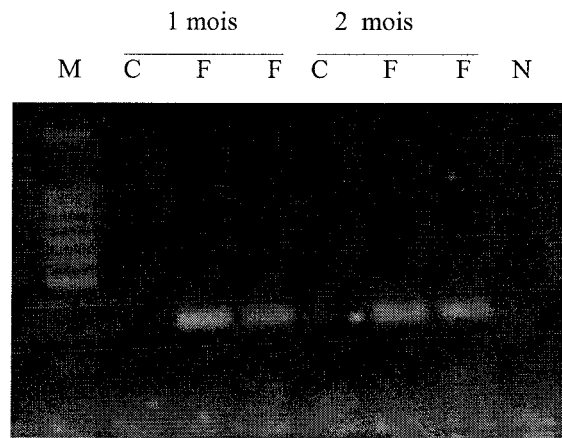


Figure 5

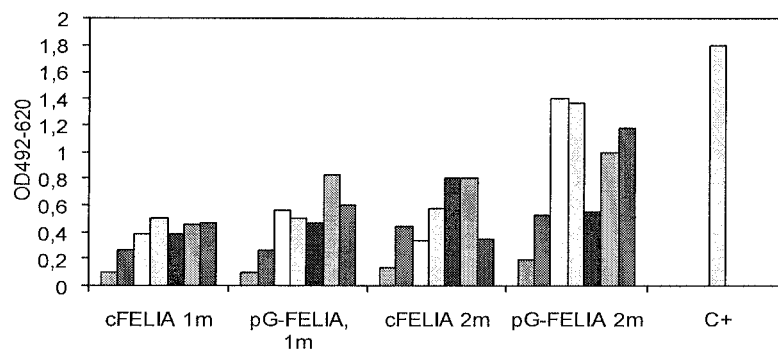


Figure 6

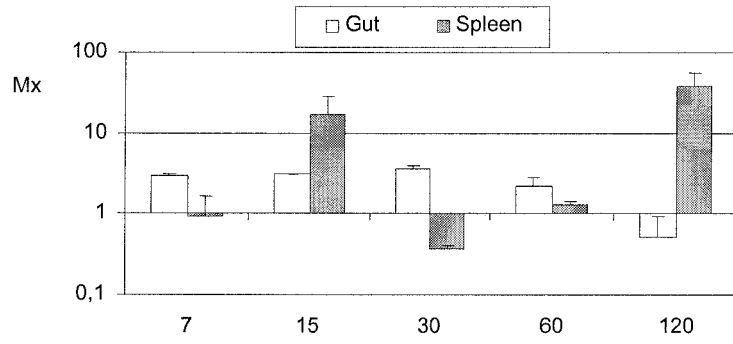


Figure 7.1

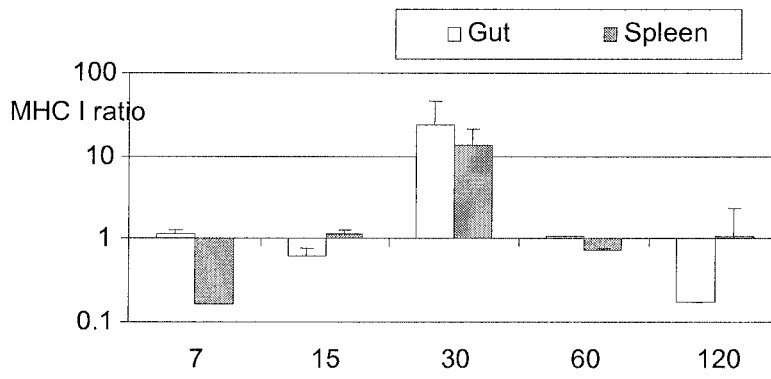


Figure 7.2

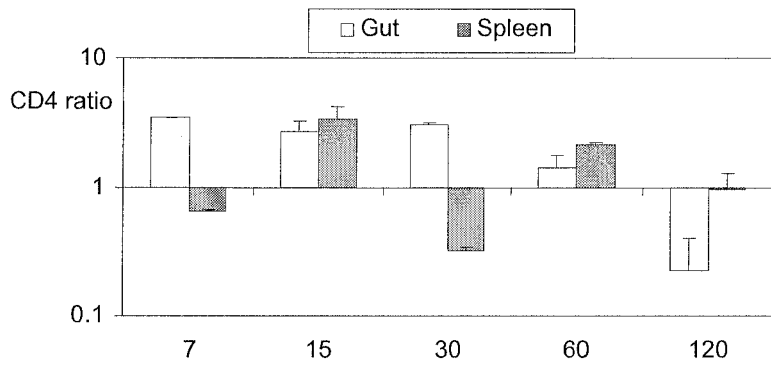


Figure 7.3

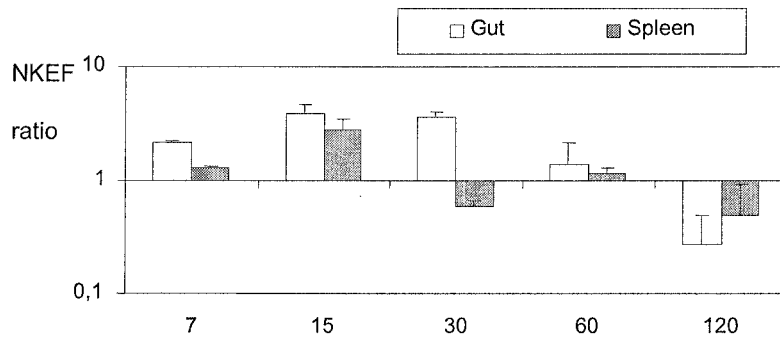


Figure 7.4

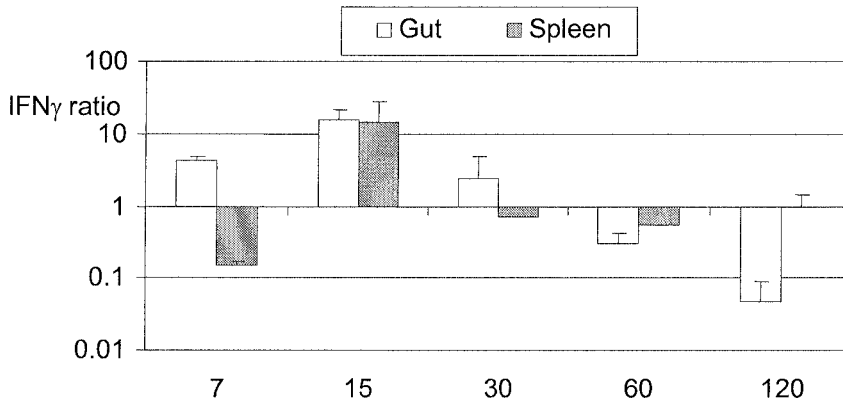


Figure 7.5

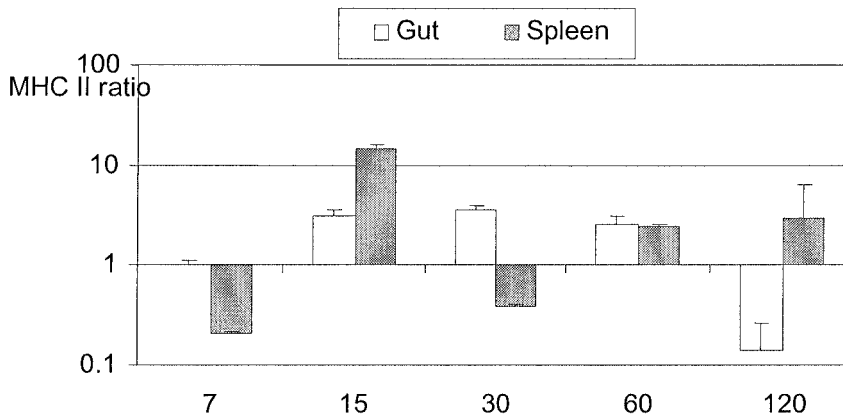


Figure 7.6

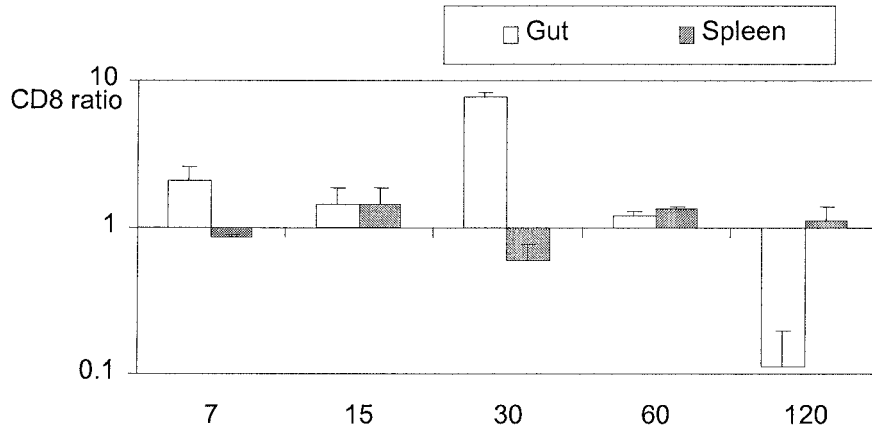


Figure 7.7

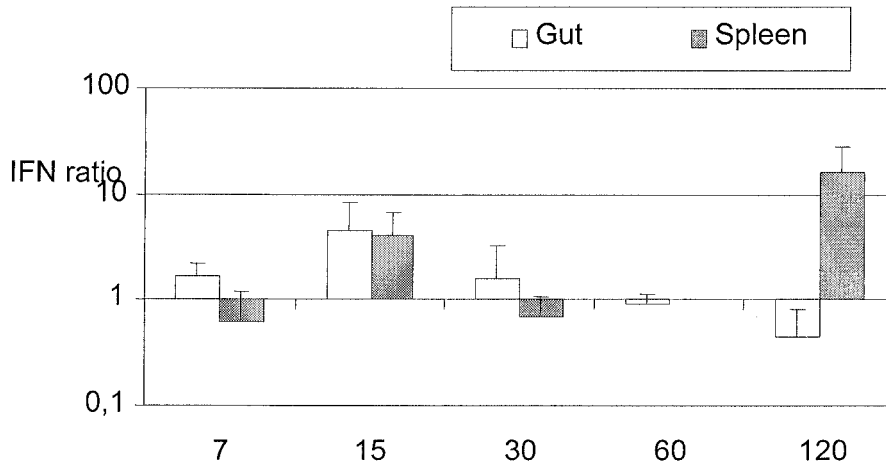


Figure 7.8

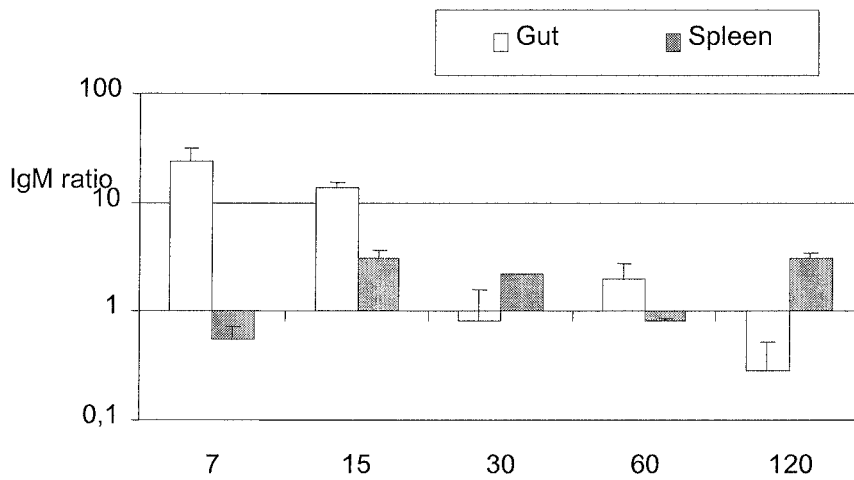


Figure 7.9

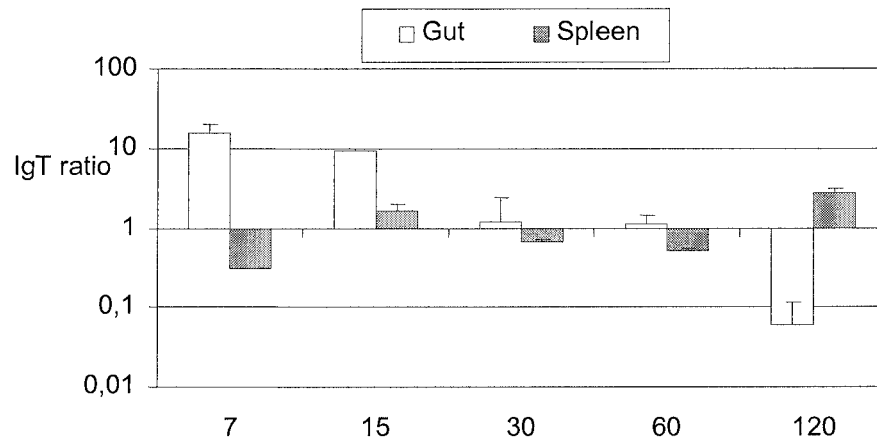


Figure 7.10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/053956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K9/127 A61K9/00 A61K48/00 A61K47/48
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K

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 practical, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROMOREN ET AL: "Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gill cells", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1717, no. 1, 10 November 2005 (2005-11-10), pages 50-57, XP005171446, ISSN: 0005-2736, DOI: DOI:10.1016/J.BBAMEM.2005.09.011 cited in the application page 51; figures 1-4 ----- -/--	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document 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>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 17 November 2011	Date of mailing of the international search report 24/11/2011
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Frelichowska, J
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/053956

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>THIERRY A R ET AL: "Lipoplex nanostructures reveal a general self-organization of nucleic acids", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1790, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 385-394, XP026093602, ISSN: 0304-4165, DOI: DOI:10.1016/J.BBAGEN.2009.03.017 [retrieved on 2009-04-01] cited in the application page 386</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
A	<p>US 7 491 409 B1 (MEERS PAUL R [US] ET AL) 17 February 2009 (2009-02-17) table 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
A	<p>ROMOREN K ET AL: "Immersion delivery of plasmid DNA - I. A study of the potentials of a liposomal delivery system in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 85, no. 1-3, 13 December 2002 (2002-12-13), pages 203-213, XP004397779, ISSN: 0168-3659, DOI: DOI:10.1016/S0168-3659(02)00279-1 cited in the application page 209</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/IB2011/053956

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 7491409	B1	17-02-2009	AT	376413 T	15-11-2007
			AU	3715900 A	21-09-2000
			BR	0008711 A	01-10-2002
			CA	2362485 A1	08-09-2000
			CN	1349402 A	15-05-2002
			CZ	20013103 A3	16-01-2002
			DE	60036861 T2	24-07-2008
			EP	1156783 A1	28-11-2001
			ES	2295018 T3	16-04-2008
			HU	0200114 A2	29-05-2002
			JP	2002538096 A	12-11-2002
			NO	20014231 A	03-10-2001
			NZ	513829 A	28-09-2001
			PL	351487 A1	22-04-2003
			US	7491409 B1	17-02-2009
			US	2009068256 A1	12-03-2009
			WO	0051565 A1	08-09-2000
			ZA	200107205 A	02-12-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2011/053956

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K9/127 A61K9/00 A61K48/00 A61K47/48 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ROMOREN ET AL: "Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gill cells", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1717, no. 1, 10 novembre 2005 (2005-11-10), pages 50-57, XP005171446, ISSN: 0005-2736, DOI: DOI:10.1016/J.BBAMEM.2005.09.011 cité dans la demande page 51; figures 1-4 ----- -/--	1-15
<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 17 novembre 2011		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/11/2011
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 Frelichowska, J

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>THIERRY A R ET AL: "Lipoplex nanostructures reveal a general self-organization of nucleic acids", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1790, no. 5, 1 mai 2009 (2009-05-01), pages 385-394, XP026093602, ISSN: 0304-4165, DOI: DOI:10.1016/J.BBAGEN.2009.03.017 [extrait le 2009-04-01] cité dans la demande page 386</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
A	<p>US 7 491 409 B1 (MEERS PAUL R [US] ET AL) 17 février 2009 (2009-02-17) tableau 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
A	<p>ROMOREN K ET AL: "Immersion delivery of plasmid DNA - I. A study of the potentials of a liposomal delivery system in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 85, no. 1-3, 13 décembre 2002 (2002-12-13), pages 203-213, XP004397779, ISSN: 0168-3659, DOI: DOI:10.1016/S0168-3659(02)00279-1 cité dans la demande page 209</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2011/053956

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 7491409	B1	17-02-2009	AT 376413 T	15-11-2007
			AU 3715900 A	21-09-2000
			BR 0008711 A	01-10-2002
			CA 2362485 A1	08-09-2000
			CN 1349402 A	15-05-2002
			CZ 20013103 A3	16-01-2002
			DE 60036861 T2	24-07-2008
			EP 1156783 A1	28-11-2001
			ES 2295018 T3	16-04-2008
			HU 0200114 A2	29-05-2002
			JP 2002538096 A	12-11-2002
			NO 20014231 A	03-10-2001
			NZ 513829 A	28-09-2001
			PL 351487 A1	22-04-2003
			US 7491409 B1	17-02-2009
			US 2009068256 A1	12-03-2009
			WO 0051565 A1	08-09-2000
			ZA 200107205 A	02-12-2002
