

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 44418 B1** (51) Cl. internationale : **G01N 1/38; C07K 14/01; G01N 1/42; C12N 7/00; C12Q 1/70; G01N 15/02**
- (43) Date de publication : **30.11.2021**

-
- (21) N° Dépôt : **44418**
- (22) Date de Dépôt : **24.01.2018**
- (30) Données de Priorité : **01.03.2017 US 62/465,981**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2018/015263 24.01.2018**
- (71) Demandeur(s) : **INTELLIGENT VIRUS IMAGING INC., 26 Pincrest Plaza Suite 2 Southern Pines, North Carolina 28387 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **HAAG, Lars ; RYNER, Martin ; COLOMB-DELSUC, Mathieu ; NORDSTRÖM, Rickard**
- (74) Mandataire : **SABA & CO. TMP**

-
- (54) Titre : **PROCÉDÉ PERMETTANT LA MESURE QUANTITATIVE DE CONTENU PARTICULAIRE À L'AIDE D'UNE IMAGERIE À L'ÉTAT HYDRATÉ**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé destiné à la mesure quantitative de contenu particulaire à l'aide d'une imagerie à l'état hydraté telle qu'une CryoTEM. L'invention concerne également un échantillon (100) de particules pseudo-virales (VLP) ou de particules virales. De préférence, l'échantillon (100) est rapidement congelé dans un liquide cryogénique à une température cryogénique. Selon l'invention, le contenu particulaire de chaque VLP dans l'échantillon congelé à température cryogénique est observé.

Abrégé

Le procédé proposé par la présente invention permet de mesurer quantitativement le contenu des particules en utilisant une imagerie à l'état hydraté, telle que la Microscopie Electronique à Transmission Cryogénique (CryoTEM). Un échantillon (100) de particules de type viral (VLP) ou de particules virales est fourni. De préférence, l'échantillon (100) est rapidement congelé dans un liquide cryogénique à une température cryogénique. Alors qu'il est à la température cryogénique, le contenu des particules de chaque VLP dans l'échantillon congelé est observé à travers la CryoTEM. Une quantité de contenu des particules de VLP est analysée pour évaluer si les VLP sont vides ou non.

10 (Fig. 1)

PROCÉDÉ PERMETTANT LA MESURE QUANTITATIVE DE CONTENU PARTICULAIRE À L'AIDE D'UNE IMAGERIE À L'ÉTAT HYDRATÉ

Domaine technique

L'invention concerne un procédé permettant de mesurer quantitativement le contenu des
5 particules, reposant sur la technique de l'imagerie à l'état hydraté, comme celle de la Microscopie
Electronique à Transmission Cryogénique (CryoTEM).

Contexte et résumé de l'invention

Dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, les particules de type viral (VLP) et les
particules de virus de type sauvage (wt) ou modifiés, comme les virus adéno-associés (AAV), sont
10 largement utilisés comme vecteurs d'administration de gènes. En général, les VLP ou les AAV à
réplication déficiente ne peuvent pas se répliquer/se reproduire, contrairement aux particules virales
réelles, et sont souvent préférées comme vecteurs d'administration de gènes. L'évaluation de leur
contenu en matière génétique constitue une question de première importance car elle est
directement liée à l'efficacité du traitement. Différents procédés sont couramment utilisés pour
15 évaluer le contenu des particules de type viral (VLP) ainsi que les particules d'AAV. Parmi ces
procédés figure la réaction en chaîne par polymérase en temps réel, également connue sous le nom
de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR). Historiquement, la Microscopie
Electronique à Transmission à coloration négative (nsTEM) a été utilisée comme procédé direct
orthogonal pris comme référence pour visualiser le contenu des particules VLP et
20 d'AAV. L'une des raisons ayant motivé cette option est que la nsTEM se caractérise par sa
rapidité et sa simplicité, et offre une bonne résolution qui permet de voir effectivement
les particules VLP et d'AAV. Une autre raison est que la nsTEM est considérée comme une
technique précise et un bon procédé pour déterminer le contenu des particules. Cependant, il a été
récemment découvert que la nsTEM présente des caractéristiques inhérentes qui en font un outil
25 peu fiable, peu sûr et même erroné lorsqu'il s'agit d'évaluer le contenu des particules VLP, d'AAV
et de virus de type sauvage (wt).

Dans le cadre de la nsTEM, la coloration est appliquée à l'échantillon avant ou après
l'application de celui-ci sur la membrane pour améliorer le contraste et protéger les particules. Un
inconvenient de la nsTEM est que la coloration recouvre les particules et ne pénètre pas
30 nécessairement les particules. Cela empêche la visualisation native directe du contenu des
particules. En d'autres termes, la coloration rend l'analyse du contenu des particules dans la
nsTEM un procédé indirect. En d'autres termes, la coloration ne fait que pénétrer les particules et
crée un contraste représentant l'intérieur des particules lorsqu'il y a une ouverture dans l'enveloppe
des particules, comme par exemple lorsque les particules sont cassées. La coloration pourrait

également négativement affecter la morphologie de l'échantillon, et en raison des étapes de buvardage (élimination du liquide d'accès au moyen d'un papier filtre) et du faible pH de la solution du colorant, il a été réalisé de manière inattendue que les particules sont souvent spatialement localement affectées par la préparation. Il a été également découvert, de manière inattendue, que l'épaisseur de la couche de colorant ne peut pas être entièrement contrôlée dans la procédure de préparation et que, dans les régions où la coloration est plus mince, les particules ne sont pas bien protégées. Il s'avère que la forme des particules vides est parfois affectée par la procédure de coloration et de buvardage même si les particules restent intactes. La procédure de préparation peut créer une bosse ou une invagination sur l'enveloppe dans la partie supérieure de la particule, là où la coloration peut s'assembler. Ceci est plus probable pour les particules vides puisque leur contenu intérieur ne leur permet pas alors de conserver la forme. Cela leur donne une apparence vide sous le microscope alors que dans les régions présentant une coloration plus épaisse, la forme des particules est intacte et il n'y a pas de différence visible entre une particule vide et une particule pleine intacte. Cela rend l'analyse difficile et peu fiable.

Dans la nsTEM, les particules sont généralement vues, classées et comptabilisées comme vides si elles apparaissent avec une frange extérieure brillante et une partie interne sombre. La justification en est que, une fois sur la membrane, une particule vide s'affaisse et la coloration remplit les parties creuses. Les particules complètes sont celles qui apparaissent comme des disques brillants comportant des parties légèrement plus brillantes au centre. La raison en est que, puisque les particules sont pleines, elles ne s'affaissent pas pendant la préparation et ne comportent donc pas de partie creuse. Il y a souvent une grande partie des particules qui ne peuvent pas être classées sans ambiguïté. Ce sont des particules dites incertaines.

Un autre problème est que, d'une part, quand une particule vide ne s'affaisse pas pendant la préparation, elle semble pleine, de l'autre, quand une particule pleine s'affaisse, en raison de fortes contraintes mécaniques à un niveau local, elle peut s'affaisser et paraître comme vide. Une découverte importante réalisée par la présente invention est que le procédé d'utilisation de la nsTEM est enclin à obtenir un nombre élevé de faux positifs et de faux négatifs.

Il existe ainsi un besoin pour une technique plus efficace et plus fiable de quantification du contenu des particules. Le procédé selon la présente invention est un procédé fiable qui permet d'évaluer le contenu des VLP, des AAV et des virus de type sauvage (wt) de manière fiable, précise et présentant un haut niveau de répétabilité et de spécificité. Plus particulièrement, le procédé est destiné à caractériser quantitativement le contenu des particules VLP, d'AAV et de virus de type sauvage (wt) en les déterminant, par imagerie, dans leur état natif hydraté, en utilisant, par exemple, la Microscopie Electronique à Transmission Cryogénique (CryoTEM). Il a également été découvert que l'analyse peut être effectuée de manière fiable en utilisant des liquides ioniques pour préparer l'échantillon destiné à l'imagerie par Microscopie Electronique à

Transmission (TEM) ou en utilisant des porte-échantillons spéciaux pour les échantillons liquides (parfois appelés TEM liquide ou TEM in situ). Le procédé de préparation de liquide ionique ressemble à la CryoTEM en ce que l'addition du liquide ionique garde les particules dans un état hydraté, ce qui dispense d'utiliser une coloration pour améliorer le contraste. Cependant, une petite quantité de coloration ou de produit chimique peut être utilement ajoutée pour préserver la structure des particules.

Le procédé de la présente invention offre une solution aux problèmes décrits ci-dessus. Plus particulièrement, le procédé permet de mesurer quantitativement le contenu des particules en utilisant une imagerie. Un échantillon de particules de type viral (VLP) ou de particules virales est présenté. L'échantillon est préparé pour maintenir l'échantillon dans un état hydraté. Le contenu des particules de chaque particule VLP ou de virus dans l'échantillon est observé grâce à un dispositif d'imagerie. Une quantité de contenu de particules est déterminée pour déterminer si les particules VLP ou de virus sont vides (104), pleines (102) ou ambiguës (106). Plus particulièrement, le procédé permet de mesurer quantitativement le contenu des particules en utilisant un procédé d'imagerie à l'état hydraté, comme la CryoTEM. Un échantillon les particules de virus ou particules de type viral (VLP), telles que des particules d'AAV ou des particules de virus est présenté. L'échantillon est préparé en vue de maintenir l'échantillon dans un état hydraté. Cela peut se faire de plusieurs manières. Pour la CryoTEM dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon est rapidement congelé dans un liquide cryogénique à une température cryogénique. Pendant qu'il est à la température cryogénique, un contenu de particules de chaque VLP dans l'échantillon congelé est observé dans le dispositif d'imagerie CryoTEM. Pour d'autres procédés d'imagerie à l'état hydraté, l'imagerie est réalisée dans un dispositif d'imagerie TEM, mais pas à des températures cryogéniques, en utilisant des porte-échantillons liquides ou en ajoutant du liquide ionique à l'échantillon lors de la préparation. Une mesure du contenu des particules est déterminée pour évaluer si les VLP sont vides ou non.

Dans un mode de réalisation alternatif, le procédé comprend également une étape consistant à automatiquement ou manuellement détecter les particules dans les images, à afficher les particules détectées sur un écran, et à automatiquement ou manuellement supprimer les particules inférieures à une limite minimale de taille et supérieures à une limite maximale de taille. Il est également possible d'automatiquement ou manuellement enlever ou ajouter des particules à l'image sans avoir à afficher d'abord les particules. Il est également possible d'afficher des particules VLP ou de virus et d'enlever ou ajouter de manière interactive des particules VLP ou de virus à l'image.

Dans un autre mode de réalisation alternatif, le procédé comprend en outre l'étape consistant à automatiquement ou manuellement classer toute particule présentant une densité

interne sans aucune limite distincte entre une enveloppe de particule et un noyau de particule comme étant une particule pleine.

5 Dans encore un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre l'étape consistant à automatiquement ou manuellement classer toute particule présentant une enveloppe externe distincte et une densité interne minimale comme étant une particule vide.

Dans un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre l'étape consistant à utiliser la Microscopie Electronique à Transmission Cryogénique (CryoTEM) pour déterminer le contenu des particules VLP.

10 Dans un autre mode de réalisation alternatif, le procédé comprend en outre l'étape consistant à déterminer le contenu des particules de virus adéno-associés (AAV).

Dans encore un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre l'étape consistant à utiliser les particules de virus AAV comme vecteurs d'administration de gènes.

15 Dans un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre l'étape consistant à classer les particules de virus AAV qui contiennent une ou plusieurs copies d'un gène comme particule pleine.

Dans encore un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre l'étape consistant à classer les particules de virus AAV qui ne contiennent aucun gène comme particule vide.

Dans un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre l'ajout d'un liquide ionique à l'échantillon pour maintenir les VLP dans un état hydraté.

20 Dans un autre mode de réalisation, le procédé comprend en outre une imagerie des particules VLP dans leur état natif, liquide et hydraté, en utilisant un porte-échantillon liquide.

Description succincte du dessin

La figure 1 représente une image schématique d'un spécimen de virus AAV observé par CryoTEM.

25 Description détaillée

La présente invention concerne un procédé d'utilisation d'une technique de l'imagerie à l'état hydraté, comme celle de la Microscopie Electronique à Transmission Cryogénique (CryoTEM), pour évaluer et mesurer quantitativement le degré de contenu à l'intérieur des particules VLP, des AAV et des particules des virus de type sauvage (wt). La mesure du contenu
30 des particules peut être une mesure (un nombre) qui correspond au degré de remplissage ou de vide de la particule. Elle peut être, par exemple, une mesure de l'intensité globale de l'intérieur de la particule ou de l'intensité normalisée avec l'intensité sur l'enveloppe de la particule. Elle peut

également être une mesure de l'importance de la surface claire ou sombre à l'intérieur de la particule. Comme mentionné ci-dessus, un aspect important de la présente invention réside dans le fait d'avoir découvert et compris que la nsTEM n'est pas appropriée pour évaluer/ analyser les particules pleines/vides du fait que l'aspect de la particule pendant qu'elle fait l'objet d'une imagerie sur la membrane dépend de plusieurs paramètres, tels que :

- L'épaisseur de la coloration (qui varie dans toute la membrane) ;
- le degré de séchage de l'échantillon (qui varie dans toute la membrane) ; et
- L'intégrité des particules (qui peuvent ou non être affectées par le processus de coloration et le processus de préparation en raison des variations locales de la contrainte mécanique subie par les particules).

Comme l'épaisseur de la coloration impacte sur l'apparence des particules, elle affecte également le résultat. L'épaisseur de la coloration varie sur la membrane, ce qui ne peut pas être contrôlé de manière fiable. Par exemple, lorsque la coloration est relativement mince, les particules sont plus exposées à des forces physiques dans la préparation et certaines particules peuvent s'affaisser de sorte que la coloration reste contenue dans le creux et ne pénètre pas à l'intérieur de la particule. Lorsque la coloration reste dans le creux de la particule, elle lui confère un aspect très similaire à celui des particules vides qui ont été remplies par la coloration. Ainsi, l'analyse du contenu des particules dépend beaucoup du fait que les particules situées dans des régions présentant une coloration épaisse ou mince font ou non l'objet d'une imagerie et d'une analyse. En raison de la répartition inégale de la coloration sur les particules lorsque la nsTEM est utilisée, les particules apparaissent souvent comme ayant des quantités de contenu différentes bien qu'en réalité cela ne soit pas le cas. C'est là un fait dont l'état de la technique ne s'était pas rendu compte par le passé.

Par contre, en utilisant la CryoTEM, l'apparence des particules ne peut pas être affectée de manière désavantageuse par une répartition inégale de la coloration (puisque aucune coloration n'y est utilisée); les particules ont ainsi plutôt tendance à se ressembler dans toutes les zones de l'espace de visualisation, ce qui rend la CryoTEM très efficace pour l'analyse du contenu proposée par la présente invention. En d'autres termes, bien qu'il soit plus compliqué d'utiliser la CryoTEM que la nsTEM pour l'analyse du contenu, il a été découvert de manière fortuite que les avantages liés aux résultats plus précis dépassaient les inconvénients découlant de l'utilisation de la technique plus compliquée de la CryoTEM. En utilisant la CryoTEM selon le procédé de la présente invention, une petite aliquote d'un échantillon est déposée sur une membrane de cuivre hydrophilisée recouverte d'un mince film de carbone. L'excès de l'échantillon est ensuite buvardé en utilisant du papier filtre. Et, avant que l'échantillon ne se dessèche, la membrane est rapidement plongée dans un liquide cryogénique où l'échantillon de particules est instantanément congelé. La congélation rapide permet à l'échantillon/au spécimen

d'être incorporé dans de la glace amorphe proche de sa forme hydratée native (c'est-à-dire non colorée) pour que les particules aient un aspect normal partout dans l'échantillon puisqu'elles ne sont affectées d'aucune coloration. Le spécimen est alors maintenu à des températures cryogéniques pendant tout le processus, tout en étant placé et observé dans le microscope électronique à transmission. L'un des avantages du procédé selon la présente invention est qu'il permet une visualisation directe des particules inaltérées avec la possibilité de voir leurs caractéristiques internes. Cela permet d'évaluer plus correctement si une particule est vide ou non. La CryoTEM, permet de voir les particules vides comme des disques ayant une densité interne infime. Ce qui s'explique par le fait que les parties internes des particules peuvent être vues au moyen de la CryoTEM et les particules vides présentent une faible densité interne. Les particules pleines apparaissent comme des disques homogènes sombres. Encore une fois, les parties internes des particules peut être vues au moyen de la CryoTEM, et les particules pleines contenant du matériel génétique en leur sein, présentent une densité interne homogène.

Exemple

Un exemple détaillé sur la manière d'utiliser la CryoTEM pour mettre en œuvre le procédé de la présente invention est présenté ci-dessous.

Préparation de la membrane

Des membranes adéquates, telles que des membranes de cuivre (Cu) d'un maillage de 400, ont d'abord été hydrophilisées en traitant les membranes avec une décharge lumineuse.

Plus particulièrement, les membranes de cuivre, recouvertes d'un film de carbone, ont été placées dans un dispositif de décharge lumineuse. Le vide a été appliqué jusqu'à ce que la pression eut atteint environ 0,5 mbar dans la chambre. Un courant d'environ 20 mA, par exemple, a été appliqué pendant approximativement 1 minute. La pression a ensuite été augmentée jusqu'à la pression ambiante. Les membranes ont été retirées et le dispositif de décharge lumineuse fut éteint.

Congélation de la membrane

Un congélateur à immersion fut allumé et la chambre à échantillons climatisée à la température et l'humidité souhaitées. Puis, après avoir changé le papier buvard dans la chambre à échantillons et préparé un bain d'éthane dans la station de refroidissement, une membrane fraîchement traitée avec une décharge lumineuse fut chargée sur la brucelle et le processus de congélation lancé. Environ 3 μL de l'échantillon furent déposés sur une membrane et, après environ 10 secondes de temps d'attente, la membrane fut buvardée avec du papier filtre puis congelée par submersion. La membrane fut transférée dans une boîte à membranes cryogénique et

stockée dans de l'azote liquide. Après avoir décongelé l'éthane et l'azote liquide en toute sécurité, le congélateur par immersion fut éteint.

Transfert de la membrane

5 La boîte à membranes cryogénique fut transférée de son emplacement de stockage vers une station de travail cryogénique pré-refroidie à l'azote liquide, dans laquelle une pompe préliminaire à support cryogénique fut introduite. Puis, après avoir transférée la membrane vers la fente de membrane du support cryogénique, celui-ci fut inséré dans la CryoTEM et le récipient de l'azote liquide fut rempli.

Imagerie de la membrane

10 A l'étape de l'imagerie de la membrane, il était important de s'assurer que le microscope avait été correctement aligné selon le protocole décrit par le fabricant et que l'image d'ébauche de la caméra était bien plate. (Il doit être entendu que l'étape d'imagerie de la membrane peut être effectuée automatiquement lorsque les images sont acquises automatiquement sans requérir qu'un opérateur soit assis au microscope pour obtenir les images. La membrane est tramée jusqu'à
15 trouver un espace approprié). Le grossissement fut alors réglé sur un champ de vision d'environ 600-1000 nm. Le point focal 0 fut trouvé avant de régler le microscope sur une légère défocalisation d'environ 6 µm. Cette étape de défocalisation pourrait être effectuée manuellement ou automatiquement sur des microscopes disposant de la fonctionnalité d'autofocus et de défocalisation. L'image acquise fut passée vers une zone voisine. L'étape d'acquisition de l'image
20 fut répétée jusqu'à l'obtention du nombre d'images souhaité.

Traitement et analyse d'image ultérieurs

Les images furent enregistrées et importées au moyen d'un logiciel d'analyse approprié, tel que le logiciel d'analyse Vironova (VAS). Les images devant être enregistrées dans le microscope furent sélectionnées et enregistrées dans un format approprié, tel que le format TIFF 16 bits, ou
25 bien automatiquement sauvegardées après l'acquisition automatique des images. Un dossier correspondant au projet dans le logiciel VAS fut créé et toutes les informations requises dans les différents nœuds furent complétées. Les images furent importées vers le nœud «Microscopie» par clic droit sur le nœud, suivi d'un clic sur «Ouvrir l'image(s)», puis en choisissant les fichiers appropriés avant de cliquer sur «Ouvrir».

Détection et classification des particules

30 Dans le nœud «Microscopie», dans le champ «Type de particule», fut introduit le «VLP (cryo)». Les images dans lesquelles devaient être détectées les particules furent sélectionnées avant un clic droit sur l'un d'eux. La fonctionnalité «exécuter la détection...» fut choisie. Les paramètres suivants furent entrés :

Algorithme de détection	Segmentation de l'ellipse
-------------------------	---------------------------

Paramètre	Valeur nominale recommandée	Plage acceptable
Contenu clair de la particule détectée	Oui	Oui
Membranes sombres	Oui	Oui
Division des gros composants	Oui	Oui
Tolérance à l'espace de bord	0,2	0,2
Largeur du bord (nm)	5	4-6
Diamètre Maximum (nm)	24	22-30
Diamètre Minimum (nm)	18	16-22
Rapport axe mineur	0,2	0,2
Forme de sortie	Circulaire	Circulaire
Raffinement post-traitement	Oui	Oui
Préférence les ellipses circulaires	Oui	Oui
Procédé de prétraitement	Détection du contour	Détection du contour

Les particules détectées furent affichées sur la représentation graphique de contrôle en utilisant l'affichage du graphique de distribution, avec « Taille » sur l'axe x et « Signal au bruit » sur l'axe y. Les particules détectées avec un signal de bruit $<0,1$ furent sélectionnées en premier avant d'être supprimées.

5

Les particules détectées, de taille <17 nm et >28 nm, furent alors sélectionnées avant d'être également supprimées. Les images furent évaluées visuellement sur l'écran et les particules d'AAV détectées faussement et incorrectement furent éliminées. Les particules correctement

détectées furent acceptées à l'aide de l'outil de vérification et les particules d'AAV qui n'ont pas été détectées au moyen de la détection automatisée furent manuellement mises en boîte.

En termes plus généraux, les étapes d'analyse suivantes furent effectuées :

5 1) les particules d'intérêt sur les images furent détectées soit manuellement, soit en utilisant un algorithme de détection approprié (comme, par exemple, la correspondance des modèles, la détection d'objets circulaires, des procédés de détection basés sur la région ou bordure etc.);

2) les fausses détections, basées sur des mesures de taille, de forme et de rapport de signal au bruit, pour chaque particule, furent supprimées (automatiquement ou manuellement ou selon une combinaison des deux); et

10 3) en cas de nécessité, des particules non détectées furent ajoutées si un algorithme de détection automatisé était utilisé.

Classification des particules

15 Dans le nœud de classe des particules de la barre d'outils de la représentation graphique de contrôle, « Contenu » fut choisi. Toutes les particules détectées furent affichées en utilisant l'outil RDP PCA dans la barre d'outils de la représentation graphique de contrôle. La représentation graphique fut tournée afin d'obtenir une séparation nette entre les deux groupes. Les particules d'un groupe furent choisies et classées dans leur classe correspondante. La classe fut déterminée en utilisant les paramètres suivants:

20 - les particules d'AAV présentant une densité interne sans limite distincte entre l'enveloppe et le noyau furent classées comme particules pleines ; et

- les particules d'AAV présentant une enveloppe externe distincte et une densité interne minimale furent classées comme particules vides.

25 Les particules de l'autre groupe furent ensuite sélectionnées et classées dans leur classe correspondante. Toutes les images furent analysées visuellement pour évaluer la classification. La classe «Incertaine» fut attribuée à toutes les particules ayant fait l'objet d'un écart entre l'évaluation de l'analyste et la classification semi-automatisée.

En termes plus généraux, les étapes suivantes furent réalisées:

1) Le contenu des particules fut mesuré en analysant l'intensité globale et la répartition de l'intensité à l'intérieur des particules; et

30 2) les particules furent classées sur la base de ces mesures. Cela aurait pu être fait de plusieurs manières, comme le seuillage manuel de chaque caractéristique mesurée (par exemple, dans le cas où la particule présenterait un aspect plus sombre qu'une certaine intensité T_f , elle est alors classée comme pleine, si elle était plus brillante qu'une autre intensité T_e , elle est

classée comme vide, et si elle se situait entre T_f et T_e , elle est alors classée comme incertaine). La classification aurait également pu être faite en marquant des groupes de particules dans des graphiques de distribution des caractéristiques ou en utilisant des procédés de classification et de regroupement automatique/ semi-automatique. D'une manière entièrement automatisée, il est possible de distinguer les particules pleines des particules vides en consultant le profil de densité interne des particules.

La figure 1 représente une illustration schématique d'une image typique de VLP provenant d'un spécimen d'AAV 100 observé par CryoTEM. Le spécimen comprend des particules pleines 102 qui apparaissent sous forme de disques sombres unis. Les particules 102 sont ainsi pleines, par exemple, d'une substance pharmaceutique ou d'un gène. En revanche, les particules vides 104 apparaissent sous forme de cercles sombres avec une intensité interne brillante, correspondant à une faible densité interne parce qu'elles ne contiennent ou ne portent pas de gène. Les particules 106 dont la classification est ambiguë semblent afficher des caractéristiques intermédiaires entre les particules pleines et les particules vides. Ainsi, l'analyse détermine à la fois la quantité/le nombre des particules contenant la substance pharmaceutique (gène) et détermine le degré de remplissage de chaque particule avec la substance pharmaceutique ou le gène. Certaines particules ne peuvent n'être que partiellement pleines d'une substance pharmaceutique alors que pour les gènes, les particules sont soit pleines d'une ou de plusieurs copies du gène, soit elles sont vides. La barre d'échelle 108 de la figure 1 représente 100 nm.

Bien que la présente invention ait été décrite selon des compositions et à des modes de réalisation préférés, il convient de souligner que certaines substitutions et modifications peuvent y être apportées sans s'écarter de l'esprit et de la portée des revendications suivantes.

REVENDICATIONS

1. Un procédé permettant de mesurer quantitativement le contenu intérieur des particules par imagerie, consistant à :
 - constituer un échantillon de particules de type viral (VLP) ou de particules virales ;
 - préparer l'échantillon afin de maintenir l'échantillon dans un état hydraté natif non coloré;
 - imagerie de l'échantillon à l'état hydraté non coloré natif dans un dispositif d'imagerie de microscopie;
 - observer le contenu intérieur des particules de chaque particule de VLP ou de virus dans l'échantillon placé dans un dispositif d'imagerie ; et
 - déterminer une quantité de contenu intérieur de particules pour déterminer si les particules VLP ou de virus sont vides , pleines ou ambiguës.

2. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à détecter, automatiquement ou manuellement, les particules sur les images et à supprimer les particules inférieures à une limite de taille minimale et supérieures à une limite de taille maximale.

3. Le procédé selon la revendication 2, dans lequel le procédé comprend également l'affichage des particules VLP ou de virus et la suppression ou l'ajout de particules VLP ou de virus à l'image, de manière interactive.

4. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à classer comme particule pleine une particule présentant une densité interne sans aucune limite distincte entre une enveloppe de particule et un noyau de particule.

5. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à classer comme particule vide une particule présentant une enveloppe externe distincte et une densité interne minime.

6. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à utiliser la Microscopie Electronique à Transmission Cryogénique (CryoTEM) pour déterminer le contenu des particules VLP.

7. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à déterminer le contenu particulaire des particules de virus adéno-associés (AAV).

8. Le procédé selon la revendication 7, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à classer comme particules pleines (102) les particules de virus adéno-associés (AAV) qui contiennent un gène.

9. Le procédé selon la revendication 8, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à classer comme particules vides (104) les particules de virus adéno-associés (AAV) ne contenant aucun gène.

10. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'ajout d'un liquide ionique à l'échantillon pour maintenir les VLP dans un état hydraté.

11. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel le procédé comprend également l'étape consistant à soumettre l'échantillon à une imagerie dans un état liquide hydraté en utilisant un porte-échantillon liquide.

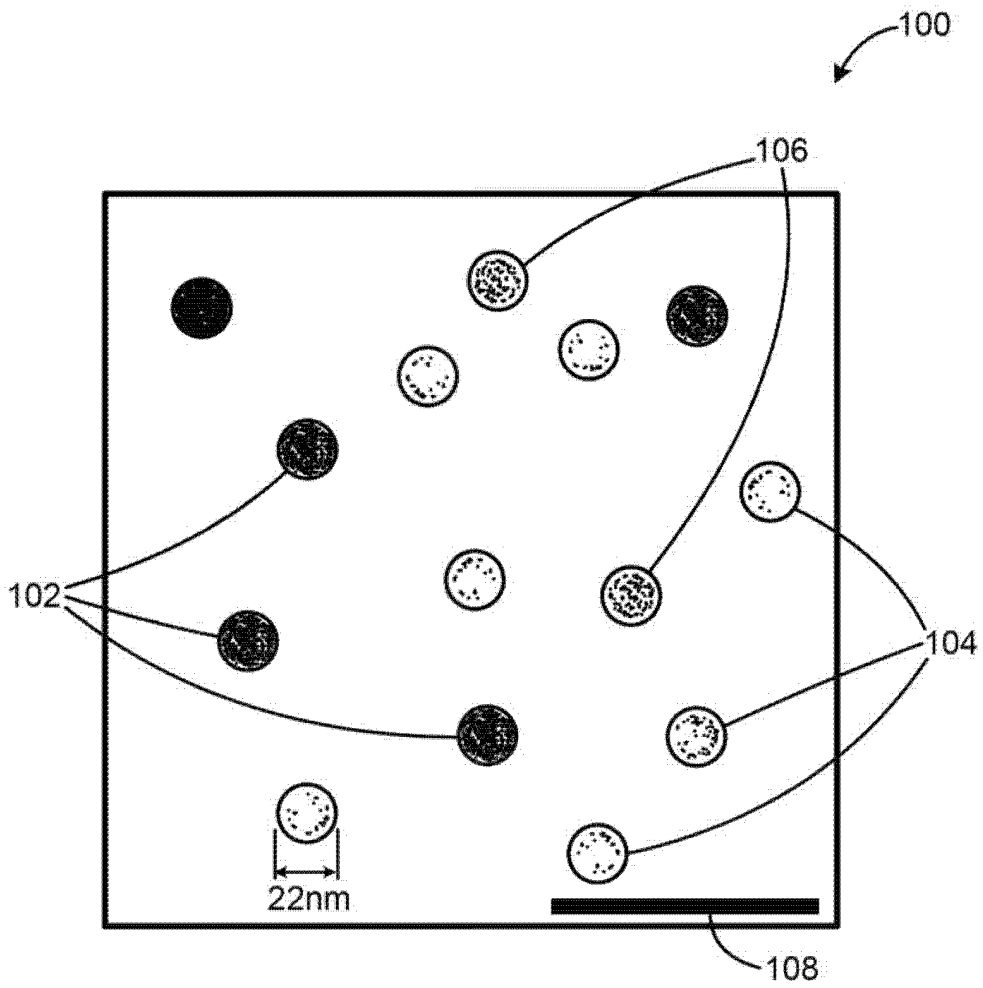



FIG. 1

**RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR
LA BREVETABILITE**

*Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée
par la loi 23-13*

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 44418	Date de dépôt : 24/01/2018
	Date d'entrée en phase nationale : 26/12/2018
Déposant : INTELLIGENT VIRUS IMAGING INC.	Date de priorité : 01/03/2017
Intitulé de l'invention : PROCÉDÉ PERMETTANT LA MESURE QUANTITATIVE DE CONTENU PARTICULAIRE À L'AIDE D'UNE IMAGERIE À L'ÉTAT HYDRATÉ	
Classement de l'objet de la demande :	
CIB: G01N15/02, C07K14/015, C07K14/005, C07K14/01	
CPC: C07K14/005, C12N7/00, C12Q1/70, G01N15/02, G01N1/42, G01N1/38	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur : LAHCHIMI Fatima Zahra	Date d'établissement du rapport : 11/11/2021
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
 - Revendications
11
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1-11 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications 1-11 Revendications aucune	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-11 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants :

D1 : US20070275449

1. Nouveauté

Aucun des documents de l'art antérieur cité ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-11 de la présente demande. Par conséquent, l'objet desdites revendications est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente invention. Il divulgue la production de particules d'AAV en solution hydratés et l'analyse de ces particules pleines et vides par microscopie électronique (les paragraphes 173-

176 et les figures 15 et 20).

La différence entre l'objet de la revendication 1 et le document le plus proche réside en ce que l'échantillon est sous forme de son état hydraté natif (non coloré) dans un dispositif d'imagerie et que les étapes consistant à observer le contenu intérieur des particules de chaque VLP et à déterminer la quantité de contenu intérieur des particules pour évaluer l'état des VLP (vides, pleins ou ambigus).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre est considéré comme la fourniture d'un procédé pour analyser et quantifier le contenu intérieur des particules d'AVV.

La solution à ce problème proposée dans la revendication indépendante de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive. En effet, l'homme du métier ne serait pas parvenu d'une manière évidente à reproduire l'invention revendiquée en partant de D1. Aussi, aucun enseignement n'a été trouvé dans le reste de l'état de la technique disponible qui aurait incité la personne du métier, en partant du document D1, à atteindre le résultat recherché. Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-11 dépendent de la revendication 1 dont l'objet est considéré inventif, comme indiqué auparavant, et elles satisfont donc également, en tant que telles, aux exigences de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13 concernant l'activité inventive.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.