



(22) Date de dépôt/Filing Date: 2000/12/01

(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 2002/06/01

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ C12N 15/12, A61K 47/48, A61K 39/395,
A61K 39/00, A61K 38/10, A61K 38/08, C07K 7/08,
C12N 5/10, C07K 7/06, C12P 21/00

(71) Demandeurs/Applicants:
INSTITUT PASTEUR, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM), FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
FIRAT, HUSEYIN, FR;
LANGLADE-DEMOYEN, PIERRE, FR;
VILMER, ETIENNE, FR;
...

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PEPTIDES IMMUNOGENIQUES MUTES DERIVES DE R9M, POLYNUCLEOTIDES LES CODANTS ET
LEURS USAGES THERAPEUTIQUES

(54) Title: IMMUNOGENIC MUTATED PEPTIDES DERIVED FROM R9M, POLYNUCLEOTIDES, CODING
POLYNUCLEOTIDES AND THEIR THERAPEUTIC USES

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention se rapporte à l'optimisation du peptide R9M sauvage et à l'utilisation des peptides obtenus à des fins de vaccination thérapeutique et/ou de vaccination préventive de la leucémie chez l'homme. Plus particulièrement, l'invention vise des peptides immunogéniques mutés dérivant de la protéine humaine de fusion TEL/AML1 comprenant la séquence peptidique R9M sauvage Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met. L'invention porte également sur les polynucléotides codant pour les peptides immunogéniques R9M mutés, les vecteurs d'expression cellulaire comprenant les séquences d'acides nucléiques exprimant les peptides immunogéniques R9M mutés et les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer sur au moins un des peptides/polynucléotides mentionnés précédemment. La présente invention concerne également l'utilisation de peptides, de polynucléotides et/ou d'anticorps tels que définis précédemment pour la préparation de vaccins, médicaments et compositions pharmaceutiques anti-tumoraux et pour la stimulation in vitro et in vivo de la réponse immunitaire chez l'homme.



(72) **Inventeurs(suite)/Inventors(continued)**: LEMONNIER, FRANCOIS, FR; ROHRLICH, PIERRE, FR;
YOTNDA, PATRICIA, ZZ

ABRÉGÉ

La présente invention se rapporte à l'optimisation du peptide R9M sauvage et à l'utilisation des peptides obtenus à des fins de vaccination thérapeutique et/ou de vaccination préventive de la leucémie chez l'homme. Plus particulièrement, l'invention vise des peptides immunogéniques mutés dérivant de la protéine humaine de fusion TEL/AML1 comprenant la séquence peptidique R9M sauvage Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met. L'invention porte également sur les polynucléotides codant pour les peptides immunogéniques R9M mutés, les vecteurs d'expression cellulaire comprenant les séquences d'acides nucléiques exprimant les peptides immunogéniques R9M mutés et les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer sur au moins un des peptides/polynucléotides mentionnés précédemment. La présente invention concerne également l'utilisation de peptides, de polynucléotides et/ou d'anticorps tels que définis précédemment pour la préparation de vaccins, médicaments et compositions pharmaceutiques anti-tumoraux et pour la stimulation *in vitro* et *in vivo* de la réponse immunitaire chez l'homme.

**PEPTIDES IMMUNOGÉNIQUES MUTÉS DÉRIVÉS DE R9M,
POLYNUCLÉOTIDES LES CODANTS ET LEURS USAGES THERAPEUTIQUES**

5 CONTEXTE DE L'INVENTION

a) Domaine de l'invention

La présente invention se rapporte à l'optimisation du peptide R9M sauvage et à l'utilisation des peptides obtenus pour la vaccination thérapeutique et/ou la
10 vaccination préventive de la leucémie chez l'homme. Plus particulièrement, la présente invention vise des peptides immunogéniques R9M mutés comme agents anti-tumoraux de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL).

b) Brève description de l'art antérieur

15 La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est le cancer le plus fréquent chez l'enfant. Environ 450 nouveaux cas sont traités chaque année en France. Malgré les progrès des protocoles de chimiothérapie, 20 à 30 % de ces enfants ont des formes graves résistantes au traitement conventionnel ou guérissant au prix de risque de toxicité sévère. Les progrès relatifs des greffes de cellules
20 souches et l'accessibilité plus grande de donneurs non apparentés n'apportent que dans certains cas la guérison à ces patients. Dans ce contexte, la recherche d'alternatives thérapeutiques à la lumière des progrès de l'immunologie apparaît légitime. Les progrès de l'immunité antitumorale peuvent être appliqués au domaine des hémopathies malignes.

25

Immunité antitumorale et anti-leucémique

L'identification des épitopes d'antigènes associés aux cellules tumorales ont permis de développer de nouvelles approches immunothérapeutiques applicables aux pathologies tumorales humaines. De nombreux laboratoires se sont alors
30 attachés à l'identification de peptides épitopiques tumoraux. Si le mélanome est la première illustration de l'intérêt de cette démarche, elle est maintenant étendue avec succès à d'autres pathologies tumorales: cancer du rein, de la vessie, du

sein, de l'utérus, et plus récemment leucémies [Robinet et coll. *Hematother* 7: 205-215, (1998); Rooney et coll., *Lancet*, 345:9-13, (1995)]. Des essais cliniques ont déjà été engagés, utilisant soit des peptides épitopiques synthétiques, soit des virus recombinants, avec des résultats encourageants même si, dans la plupart
 5 des cas, la caractérisation des réponses lymphocytaires T induites n'a pu être assurée.

L'existence d'une réponse immune anti-leucémique a été observée dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques. En effet, les greffes autologues ou allogéniques déplétées en cellules T sont associées à de fréquentes rechutes.
 10 Par contre les greffes non T déplétées sont associées à un risque de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) plus élevé mais celui de rechute est plus faible: le greffon a donc un effet anti-leucémique (GVL : graft versus leukemia). Le rôle de la réponse immune dans les hémopathies malignes a été confirmé par l'effet thérapeutique remarquable mais inconstant des transfusions de lymphocytes du
 15 donneur en cas de rechute post greffe surtout dans les LMC. L'anergie induite par l'absence d'expression de B7 sur les cellules leucémiques pourrait expliquer que cet effet GVL est plus marqué pour les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) que pour les LAM et les LAL. Néanmoins, plusieurs équipes, dont celle de la Demanderesse, a montré l'existence de CTL spécifiques contre les cellules
 20 leucémiques de type LAL de type B et LAM [Boyer et coll., *Blood*, 89:3477-85, (1997); Buzyn et coll., *Europ. J. Immunol.*, 27:1066-72, (1997); Heslop et coll., *Nat. Med.* 2:551-555, (1996); Yotnda et coll., *J. Clin. Invest.* 101:2290-6, (1998); Yotnda et coll., *J. Clin. Invest.* 102:455-62, (1998)]. Ainsi, l'équipe de la Demanderesse a démontré que les translocations chromosomiques peuvent
 25 générer des néo-antigènes. Dans le cas de la LMC et de la LAL-B avec t(12;21), les produits de fusion BCR-ABL ou TEL-AML1 exprimés uniquement sur les cellules leucémiques induisent des CTL spécifiques.

Les gènes TEL et AML1 et la translocation (p12;q21)

30 La translocation t(12;21) intéresse 25% des LAL de la lignée B chez l'enfant. Elle est normalement mise en évidence par des techniques moléculaires (RT-PCR) ou d'hybridation *in situ* (FISH). Les gènes TEL sur le chromosome 12 et

AML1 sur le chromosome 21 sont impliqués dans cette translocation. Le gène TEL (Translocation ETS Leukemia) appartient à la famille des gènes ETS qui codent pour des facteurs de régulation de transcription [Fenrick et coll., *Mol. Cell. Biol.* 20:5828-39 (2000)]. Par leur domaine ETS, ces protéines se lient à l'ADN au
 5 niveau de séquences spécifiques [Guidez et coll., *Blood* 96:2557-61 (2000)]. Des études ont montré une perte allélique de TEL dans 15-40 % des cas de LAL de la lignée-B de l'enfant. Ce gène répresseur est également impliqué dans les translocations t(5;12), t(9;12) et t(12;21) impliquées dans les hémopathies malignes.

10 Le gène AML1 (Acute Myeloide Leukemia-1) appartient à une famille de gènes codant pour des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un domaine de fixation à l'ADN, le domaine *runt*. Le gène AML1 est composé de 9 exons. AML1 est exprimé dans tous les tissus à l'exception du cœur et du
 15 cerveau. Il coderait pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation de la lignée myéloïde. Ce gène est également associé aux translocations t(8;21) et t(3;21) rencontrées dans les leucémies aiguës myéloblastiques.

Le point de cassure de la translocation t(12;21) est localisé entre les exons 5 et 6 de TEL et dans les introns 1 ou 2 de AML1. Le transcrit de fusion TEL AML1 est toujours retrouvé dans l'ARN des cellules lymphoblastiques de patients
 20 porteurs de la translocation (12;21) mais jamais dans les tissus normaux. Ce transcrit est composé de la partie NH₂ terminale de TEL et de la presque totalité de AML1. Deux transcrits de longueur différente et dont l'extrémité 5' varie sont produits. La forme la plus longue est présente dans la majorité des cas de LAL. Le rôle de ces protéines de fusion dans la leucémogénèse reste encore à définir.

25 Aspects cliniques

Les LAL de la lignée B exprimant le gène de fusion TEL/AML1 atteignent des enfants âgés de 1 à 10 ans ayant habituellement moins de 50 000 blastes au diagnostic, sans hyperdiploïdie à l'examen cytogénétique [Baruchel et coll., *Br. J.*
 30 *Haematol.* 99:101-106 (1997); Ma et coll., *Hematol. Oncol.* 17:91-95 (1999)]. La présence du transcrit TEL/AML1 a été associé à une diminution du risque de rechute dans plusieurs études.

Ces études ne doivent pas masquer la relative hétérogénéité de ces LAL: différentes publications ainsi que l'expérience personnelle des présents inventeurs suggèrent qu'environ 15% des cas de LAL avec translocation (12;21) se caractérisent par leur très mauvais pronostic sans que les mécanismes responsables en soient connus [Seeger et coll., Blood 91:1716-22 (1998)]. Cette population d'enfants est particulièrement concernée par de futurs protocoles d'immunothérapie.

Résultats du domaine public obtenus dans les laboratoires de la Demanderesse

1) Réponse T cytotoxique contre la protéine chimère codée par le gène de fusion TEL- [Yotnda et coll., J. Clin. Invest. 102:455-62 (1998)]

Le produit des gènes chimères issus de la translocation (12;21) est une néoprotéine qui est exprimée dans les cellules leucémiques de type LAL-B commun et qui peut être détectée par Western blot. La Demanderesse a postulé que des peptides issus de cette région de jonction pouvaient être des antigènes tumoraux reconnus par des effecteurs cytotoxiques. Dans un premier temps, la capacité de 9 nonapeptides jonctionnels d'inhiber la fixation sur des molécules HLA-A*0201 solubles a été mesurée. Un nonapeptide RIAECILGM (R9M) codé par cette région de fusion a été identifié qui présente une haute affinité pour la molécule HLA-A2 soluble.

Au diagnostic, avant tout traitement, chez un patient HLA A2 porteur de la translocation (12;21) une lignée lymphocytaire T-CD8⁺ a été établie à partir de la moelle en présence de cellules blastiques autologues et de la forme soluble du ligand de CD40. Ces lymphocytes T lysent spécifiquement la leucémie autologue et reconnaissent le peptide à la surface des cibles HLA-A*0201 chargées avec le peptide R9M. Des résultats similaires sont obtenus au niveau clonal. L'ensemble des données résultant de cette étude suggère que le peptide R9M de cette translocation soit immunogène et induise in vitro chez les patients HLA-A*0201 des réponses T spécifiques.

Cependant, l'évolution naturelle de la maladie, malgré l'existence de cette réponse immune, montre que la réponse développée est insuffisante pour contrôler cette prolifération tumorale, ou que les cellules tumorales interfèrent

5 négativement avec les processus d'activation et de mise en œuvre de la réponse cytotoxique. La capacité de R9M d'induire des CTLs à partir du sang périphérique de donneurs sains a été démontrée. Ces CTL spécifiques sont capables de reconnaître des cibles HLA-A*0201 pré-incubées avec le peptide sélectionné et qu'ils reconnaissent des cellules leucémiques exprimant la protéine de fusion TEL-AML1 issues de patients HLA A2.

2) *Absence de réponse antitumorale efficace dans les LAL [Yotnda et coll., Exp. Hematol. 27:1375-83, (1999)]*

10 L'expression de certaines molécules de co-stimulation a été étudiée à la surface des lymphoblastes. Dans la majorité des cas, la molécule B7.1 est absente de la surface des blastes mais est exprimée en présence de la forme soluble du ligand de CD40. Il apparaît donc vraisemblable que les signaux d'activation délivrés aux lymphocytes-T sont insuffisants [Dilloo et coll., *Blood* 15 90:1927-33 (1997)]. Cette conclusion est supportée par un certain nombre de données complémentaires tirées de l'étude directe des lymphocytes-T CD3⁺ médullaires au diagnostic. Ces lymphocytes ont des profils de sécrétion de cytokines de type Th2 et sont plus fréquemment en apoptose. Ce processus d'anergie des CTLs spécifiques a également été mis en évidence dans d'autres 20 pathologies tumorales [Boyer et coll., *Blood* 89:3477-85 (1997); Dunussi-Joannopoulos et coll., *Blood* 89:2915-24 (1997)].

Optimisation des peptides épitopiques de la région de fusion de TEL AML

25 Les inventeurs de la présente invention ont observé que le complexe R9M/HLA A2.01 à la surface des cellules T2 était peu stable. Des efforts répétés d'immunisation des souris transgéniques HLA A2.01 avec le peptide R9M ont aussi montré l'inconstance et la faiblesse des réponses de CTL induites. Il apparaît donc clairement que le peptide R9M doit être optimisé pour devenir un agent antitumoral efficace.

30 Il existe donc un besoin pour des peptides R9M mutés présentant une haute affinité pour la molécule HLA-A2.01 de manière à former avec cette molécule un complexe stable ayant une demi-vie supérieure à la demi-vie du complexe

peptide-R9M sauvage/HLA-A2.01 afin de rendre le peptide capable d'induire *in vivo* ou *in vitro* une réponse immunitaire cytotoxique.

Il existe aussi un besoin pour des peptides R9M mutés qui peuvent ralentir le développement de cellules tumorales lymphoblastiques lorsque administrés à un patient leucémique.

Plus particulièrement, il existe un besoin pour des peptides R9M mutés capables d'induire une réponse immunitaire contre le développement de cellules tumorales lymphoblastiques après administration à un receveur.

La présente invention répond à ces besoins et à d'autres besoins comme cela sera apparent à une personne versée dans le domaine à la lecture de la présente description de l'invention.

RÉSUMÉ DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte à l'optimisation du peptide R9M sauvage et à l'utilisation des peptides obtenus à des fins de vaccination thérapeutique et/ou de vaccination préventive de la leucémie chez l'homme.

Plus particulièrement, l'invention vise des peptides immunogéniques mutés dérivant de la protéine humaine de fusion TEL/AML1 comprenant la séquence peptidique R9M sauvage (Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met), lesdits peptides étant mutés dans la séquence peptidique R9M. Préférentiellement, l'invention vise des peptides comprenant une séquence peptidique d'au moins neuf (9) acides aminés consécutifs dérivée substantiellement de la séquence peptidique R9M sauvage.

Par peptide immunogène on entend un peptide capable d'induire une réponse cellulaire ou humorale. Préférentiellement, les peptides immunogéniques de l'invention sont caractérisés en ce qu'ils ralentissent le développement de cellules tumorales lymphoblastiques et induisent une réponse immunitaire contre le développement de cellules tumorales lymphoblastiques après leur administration à un patient leucémique. Parmi les peptides préférés de la présente invention, on retrouve les peptides ayant comme séquence peptidique: RIAESILGM, RIAEAILGM, RIAE α -butILGM, YIAESILGM, YIAEAILGM, et YIAE α -butILGM.

L'invention porte également sur les polynucléotides codant pour les peptides immunogéniques R9M mutés, les vecteurs d'expression cellulaire comprenant les séquences d'acides nucléiques exprimant les peptides immunogéniques R9M mutés et les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer sur au moins un des peptides/polynucléotides mentionnés précédemment.

L'invention porte aussi sur des médicaments et des compositions pharmaceutiques comprenant les peptides, les polynucléotides et/ou les anticorps objets de l'invention.

La présente invention concerne également l'utilisation de peptides, de polynucléotides et/ou d'anticorps tels que définis ci-dessus comme agents anti-tumoraux, pour la préparation d'un vaccin antitumoral et pour la stimulation *in vitro* et *in vivo* de la réponse immunitaire chez l'homme.

Un des avantages majeurs de la présente invention est que les peptides R9M mutés obtenus présentent une haute affinité pour la molécule HLA-A2.01 et forment avec cette molécule un complexe stable les rendant capables d'induire *in vivo* ou *in vitro* une réponse immunitaire cytotoxique.

De nombreux autres objectifs et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description non-limitative de l'invention qui suit.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

La **Figure 1** montre le peptide épitopique R9M sauvage.

La **Figure 2** illustre à l'aide de graphiques la réponse primaire de cellules CTL humaines contre des cellules-cibles HLA-A2.1⁺T2 stimulées avec différents peptides. **Colonne A** = cellules T2 stimulées avec les peptides R9M mutés; **Colonne B** = cellules T2 stimulées avec le peptide R9M sauvage.

La **Figure 3** illustre à l'aide de graphiques la provocation de tumeurs chez des souris HHD par des cellules EL4 S3-Rob-HHD exprimant la protéine de fusion TEL/AM1.

5 La **Figure 4** illustre le taux de survie de souris HHD immunisées avec le peptide R9M sauvage ou les peptides R9M mutés, les souris ayant des tumeurs provoquées par des cellules EL4 S3-Rob-HHD exprimant la protéine de fusion TEL/AM1.

10 DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

Le peptide R9M sauvage a comme séquence peptidique Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met (RIAECILGM). Cette séquence peptidique correspond à une région de la protéine humaine de fusion TEL/AML1.

15 La présente invention se rapporte à l'optimisation du peptide R9M et de l'utilisation des peptides obtenus pour la vaccination thérapeutique et/ou la vaccination préventive de la leucémie chez l'homme. La nomenclature utilisée pour décrire la séquence des peptides de la présente invention est la nomenclature internationale utilisant le code à trois lettres ou le code à une lettre, et où l'extrémité amino-terminale est présentée à gauche et l'extrémité carboxy-
20 terminale est présentée à droite.

Il convient de rappeler que dans l'ensemble de la description, on entend désigner par "acide aminé" aussi bien les acides aminés naturels que les acides aminés non-naturels. Par "acide aminé naturel", on entend désigner les acides aminés sous forme L que l'on peut trouver dans les protéines naturelles,
25 c'est-à-dire alanine, arginine, asparagine, acide aspartique, cystéines, glutamine, acide glutamique, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine et valine.

Cependant, la présente invention concerne également les peptides ayant des acides aminés non-naturels, c'est-à-dire les acides aminés précédents sous
30 leur forme D, ainsi que les formes homo de certains acides aminés comme l'arginine, la lysine, la phénylalanine et la sérine ou les formes nor de la leucine ou de la valine. Dans certains cas, il est avantageux d'utiliser l'acide alpha-

aminobutyrique, et il est également possible d'envisager l'utilisation d'autres acides aminés comme par exemple l'agmatine (Agm), l'acide alpha-aminoisobutyrique (Aib), le N-formyle-Trp (F-Trp), la sarcosine, la statine, l'ornithine, la désaminotyrosine et autres acides aminés modifiés. Tous les acides aminés peuvent être utilisés à condition qu'ils ne soient pas toxiques à l'humain et qu'ils ne modifient pas la capacité des peptides obtenus à induire une réponse immunitaire *in vivo* ou *in vitro*.

Par "peptide dérivé" d'une protéine sauvage, on entend tous les peptides qui possèdent une séquence peptidique substantiellement identique, au moins en partie, à la séquence peptidique de la protéine sauvage. Il peut s'agir par exemple de peptides modifiés chimiquement ayant une séquence peptidique 100% identique à une portion de la protéine sauvage. Il peut s'agir aussi de peptides hybrides ayant une première portion 100% identique à une première portion de la protéine sauvage et une seconde portion aucunement/partiellement identique à une seconde portion de la protéine sauvage. Il peut s'agir encore de peptides ayant une homologie totale/partielle avec une portion de la protéine sauvage. Selon un mode de réalisation partielle de l'invention, les peptides comprennent une séquence peptidique dérivée substantiellement de la séquence peptidique R9M de la protéine humaine de fusion TEL/AML1, cette séquence ayant au moins neuf (9) acides aminés consécutifs.

Par peptides "mutés" dérivés d'une protéine sauvage, on entend tous les peptides qui ont été obtenus suite une modification de ladite protéine sauvage, que ce soit une modification par addition, délétion ou substitution de un ou plusieurs des acides aminés de la protéine sauvage. Il peut également s'agir d'une modification apportée par l'addition de chaînes carbonées fixées sur au moins un des acides aminés de la protéine sauvage ou sur au moins un des acides aminés des peptides pour lesquels il existe une substitution ou une modification de l'un des acides aminés par rapport à la protéine sauvage. Plus particulièrement, la présente invention couvre les peptides qui dérivent de la protéine humaine de fusion TEL/AML1 qui comprend l'épitope sauvage R9M et qui ont été mutés dans la séquence R9M. La présente invention couvre toutefois tout polypeptide comprenant une séquence peptidique mutée ou dérivée de la séquence sauvage

R9M et capable de produire des effets biologiques au moins équivalents à ceux dont la séquence spécifique est fournie ci-après.

Une personne versée dans le domaine de l'invention saura obtenir différents peptides dérivés et mutés et elle saura également déterminer quels
5 sont, parmi tous les peptides obtenus, les peptides ayant une activité biologique adéquate. Préférentiellement, la séquence du peptide (incluant ses modifications chimiques le cas échéant) sera telle que le peptide obtenu présentera une affinité accrue pour la molécule HLA-A2.01 de sorte qu'il puisse former avec cette
10 molécule un complexe stable ayant une demi-vie supérieure (DC_{50}) à la demi-vie du complexe peptide-R9M sauvage/HLA-A2.01. Le terme DC_{50} caractérisant la demi-vie du complexe peptide HLA-A2.01 est décrit dans la publication "*H-2 class 1 knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies*" (European Journal of Immunology : 29:3112-21, 1999). Cette demi-vie devrait normalement rendre
15 capable d'induire *in vivo* ou *in vitro* une réponse immunitaire cytotoxique. Préférentiellement, le peptide obtenu ralentira la croissance de cellules tumorales lymphoblastiques lorsque administré à un receveur leucémique et déclenchera une réponse T-cytotoxique contre les cellules leucémiques de type LAL-B commune avec t(12;21) du receveur leucémique.

20 De manière avantageuse, les inventeurs ont découvert que la substitution de l'acide aminé cystéine en position 5 de la séquence peptidique R9M sauvage par un acide aminé neutre choisi parmi la sérine, l'alanine et l'acide α -aminobutyrique et/ou la substitution de l'acide aminé arginine en position 1 de la séquence peptidique R9M sauvage par un acide aminé aromatique tel que la
25 tyrosine conférait aux peptides mutés une activité biologique accrue. À cet effet, les inventeurs ont découvert que les peptides ayant comme séquence peptidique RIAESILGM, RIAEAILGM, RIAE α -butILGM, YIAESILGM, YIAEAILGM, et YIAE α -butILGM étaient particulièrement intéressants. Par " α -but", on entend qu'un acide alpha-aminobutyrique est fixé sur un acide glutamique.

30 Il est également possible de prévoir d'autres modifications (chimique ou peptidique) permettant aux peptides de franchir certaines barrières biologiques, de montrer une meilleure solubilisation, de faciliter leur incorporation dans des formes

galéniques particulières comme par exemple des liposomes ou des microparticules. Il convient d'ailleurs de remarquer à ce propos que les peptides selon la présente invention peuvent se présenter sous forme déglycosylée ou glycosylée si cela est nécessaire.

- 5 Les peptides selon la présente invention peuvent être préparés par tout procédé approprié. Ils peuvent notamment être obtenus par synthèse chimique mais il est également possible de les obtenir par voie biologique en utilisant notamment différents vecteurs dans les cultures cellulaires appropriées tel que cela sera décrit ci-après. Il convient également de remarquer que, dans certains
- 10 cas et suivant la méthode de préparation, il pourra être nécessaire de renaturer certaines structures tertiaires des peptides obtenus.

Les séquences d'ADN codant pour les peptides de l'invention peuvent être aisément déterminées à partir des séquences en acides aminés. Le Tableau 1

15 suivant donne la séquence nucléotidique du peptide R9M sauvage et les séquences nucléotidiques déduites de plusieurs peptides R9M mutés:

TABLEAU 1

SÉQUENCE PEPTIDIQUE	SÉQUENCE(S) NUCLÉOTIDIQUE(S)
RIAECILGM (R9M sauvage)	AGA ATA GCA GAA TGC ATA CTT GGA ATG
RIAESILGM	AGA ATA GCA GAA AGC ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA AGT ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA TCA ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA TCC ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA TCG ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA TCT ATA CTT GGA ATG
RIAEAILGM	AGA ATA GCA GAA GCA ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA GCC ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA GCG ATA CTT GGA ATG AGA ATA GCA GAA GCT ATA CTT GGA ATG
YIAESILGM	TAC ATA GCA GAA AGC ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA AGC ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA AGT ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA AGT ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA TCA ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA TCA ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA TCC ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA TCC ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA TCG ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA TCG ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA TCT ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA TCT ATA CTT GGA ATG
YIAEAILGM	TAC ATA GCA GAA GCA ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA GCA ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA GCC ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA GCC ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA GCG ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA GCG ATA CTT GGA ATG TAC ATA GCA GAA GCT ATA CTT GGA ATG TAT ATA GCA GAA GCT ATA CTT GGA ATG

Ainsi, l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un peptide de l'invention, par transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression (plasmide, cosmide, virus, etc) comprenant les séquences d'ADN codant pour les peptides de l'invention, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du peptide dans le milieu de culture. L'invention concerne donc également tout hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence de nucléotides codant pour un peptide selon l'invention. L'utilisation de vecteurs pour l'expression de protéines et de peptides dans les cellules d'un hôte, notamment l'humain, est connue et ne sera pas décrite en détail. Les constructions spécifiques dépendent évidemment de l'hôte, de l'épitope et du vecteur retenu.

Les peptides mutés de la présente invention et les polynucléotides les codant peuvent être utilisés de nombreuses façons comme agent antitumoral ou pour la préparation d'un vaccin antitumoral. Par exemple, ils peuvent être utilisés dans un procédé de stimulation *in vitro* de la réponse CD8-cytotoxique, comprenant la séparation des cellules lymphoïdes ou non d'un patient et l'incubation *in vitro* desdites cellules en présence d'au moins un peptide immunogénique muté et/ou en présence d'au moins un polynucléotide objets de l'invention. Ces cellules, qui expriment les épitopes issus de TEL/AML1, peuvent stimuler *in vitro* une réponse cytotoxique spécifique anti-leucémique, les cellules TCD8 stimulées *in vitro* étant ultérieurement injectées au patient leucémique. On peut aussi utiliser les peptides et polynucléotides objets de l'invention dans un procédé d'induction *in vivo* de la réponse TCD8 anti-leucémique, via l'injection de cellules exprimant les épitopes issus de TEL/AML1 décrites précédemment à un patient leucémique, les cellules injectées permettant l'induction d'une réponse TCD8 anti-leucémique *in vivo*.

Les peptides mutés de la présente invention et les polynucléotides les codant peuvent aussi être utilisés pour préparer des anticorps polyclonal ou monoclonal se fixant sur au moins un peptide/polynucléotide objet de l'invention. La

présente invention vise donc également de tels anticorps purifiés qui peuvent être obtenus par des techniques très bien connues.

Les peptides mutés de la présente invention et les polynucléotides les codant peuvent être utilisés pour la fabrication d'un médicament et ceci dans le but d'être administrés *in vivo* à des fins de vaccination thérapeutique et/ou de vaccination préventive de la leucémie chez l'homme, tout particulièrement la leucémie aiguë lymphoblastique LAL-B commune avec t(12;21). Ces médicaments peuvent comprendre au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par les peptides immunogéniques et les polynucléotides ci-dessus décrits et des cellules-T lytiques sensibilisées *in vitro* par la mise en contact d'un peptide immunogénique selon l'invention.

Dans un mode de réalisation privilégié de l'invention, au moins une portion des peptides immunogéniques/polynucléotides selon l'invention est conjuguée à un support sur lequel elle est absorbée ou fixée de façon covalente ou non-covalente à son extrémité C et/ou N-terminale. Le support peut être constitué de molécules-porteuses (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques. Ces molécules porteuses peuvent permettre notamment d'augmenter l'immunogénicité des peptides de l'invention par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. À titre d'exemple de molécules porteuses, on mentionnera des protéines naturelles telles que l'anatoxine tétanique, l'ovalbumine, des sérums albumines, des hémocyclamines, le PPD (purified protein derivative) de la tuberculine, etc. À titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine). À titre de supports hydrocarbonés ou lipidiques, on mentionnera les acides gras saturés ou insaturés. Le support peut également prendre la forme de liposomes, de particules, de vésicules, de microsphères ou de billes de latex ou de polystyrène.

Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux mentionnés précédemment peuvent eux aussi être utilisés pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de la leucémie.

L'invention porte aussi sur des compositions thérapeutiques comprenant un médicament ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux tel que décrit précédemment et un véhicule pharmaceutique acceptable. Ces compositions peuvent être avantageuses pour le traitement ou la prévention de la leucémie aiguë lymphoblastique B commune avec t(12;21) chez l'humain. Bien entendu, l'utilisation de compositions à base d'anticorps nécessite généralement que ceux-ci soient compatibles avec l'administration à l'être humain. Il peut notamment s'agir d'anticorps humanisés par des techniques connues ou directement exprimés *in situ* à partir de la séquence d'ADN.

10 Les compositions selon la présente invention peuvent se présenter sous une forme solide ou liquide quelconque habituelle pour l'administration pharmaceutique, c'est-à-dire par exemple des formes d'administration liquide, en gel, ou tout autre support permettant par exemple la libération contrôlée. Parmi les compositions utilisables, on peut citer notamment les compositions injectables
15 plus particulièrement destinées aux injections dans la circulation sanguine chez l'humain.

Les compositions de l'invention peuvent comporter également des composants augmentant l'immunogénicité des peptides, notamment d'autres peptides immunogènes, des adjuvants d'immunité spécifiques ou non tels que
20 l'adjuvant de Freund, des polysaccharides ou des composés équivalents.

La présente invention concerne de plus des compositions destinées à être administrées afin d'exprimer *in situ* les peptides décrits précédemment. Par exemple, en injectant l' "ADN nu" codant pour les peptides immunogéniques de l'invention, cette injection conduit, dans un certain nombre de cas, à l'expression
25 du peptide codée et à une réponse immunitaire contre ledit peptide. On pourra également utiliser des systèmes d' "ADN nu" mais comportant leur propre système d'expression ou des vecteurs d'expression tel que décrit précédemment. Les vecteurs d'expression sont susceptibles, dans certains cas, d'améliorer leur activité des peptides exprimés. Les systèmes de vaccination mettant en œuvre
30 des séquences d'ADN sont connus et sont déjà largement décrits dans la littérature.

L'invention vise aussi les cellules tumorales obtenues par double transfection de souris EL4 S3-Rob (β 2-microglobuline murine négative) avec:

- 1) le gène humain codant la molécule HHD; et
- 2) le gène humain codant pour la protéine de fusion TEL/AML1 comprenant :
 - 5 a) la séquence peptidique R9M sauvage (Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met); ou
 - b) une séquence peptidique R9M muté codant pour un peptide immunogénique muté tel que défini ci-dessus.

Ces cellules permettent l'obtention d'un modèle animal de vaccination anti-leucémique ce qui valide les expériences de vaccination. Les méthodes pour
10 obtenir ce genre de cellules sont bien connues dans le domaine et ne seront pas décrites en détail. La méthode pour obtenir les souris EL4 S3-Rob a été décrite en détails par Pascolo et coll. dans J. Exp Med., 185:2043-51 (1997).

La présente invention couvre tout particulièrement la lignée cellulaire
15 doublement transfectée par les gènes codant pour la molécule HLA-A2.01 et la translocation TEL/AML1. Cette lignée cellulaire est appelée "*EL4 Rob.HHD.TEL.AML1*" et elle a fait l'objet d'un dépôt biologique auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, Paris) le 1^{er} décembre 2000, et s'est vue attribuer le No. d'enregistrement I-2587.

20 L'invention vise encore un procédé de sélection de molécules thérapeutiques pouvant induire une réponse immunitaire protectrice *in vivo* contre des peptides sauvages tumoraux, viraux, bactériens, ou fongiques. Ce procédé est caractérisé en ce que:

a) on administre à un modèle animal compatible une lignée cellulaire tumorale
25 EL4S3-rob doublement transfectée par des séquences nucléotidiques codant pour la molécule HHD et des séquences nucléotidiques codant pour lesdits peptides sauvages tumoraux, viraux, bactériens ou fongiques, ledit modèle animal ayant un génotype compatible avec celui de ladite cellule tumorale transfectée et ayant été préalablement immunisé avec lesdites molécules que
30 l'on cherche à sélectionner;

b) on compare la capacité desdites cellules transfectées d'induire une réponse *in vivo* contre les épitopes desdits peptides tumoraux, viraux bactériens,

5 fongiques avec la capacité desdits peptides sauvages tumoraux, viraux, bactériens, ou fongiques d'induire une réponse *in vivo* contre les épitopes desdits peptides sauvages chez un modèle animal soumis à une immunisation préalable avec les séquences peptidiques sauvages desdites molécules thérapeutiques.

10 Dans un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le modèle animal compatible est obtenu en utilisant d'une part une souris ayant un CMH inactif et non exprimé remplacé par le gène codant pour HLA-A2.01 et, d'autre part, une lignée cellulaire tumorale transfectée par au moins le gène codant pour la molécule HLA-A2.01. Il est toutefois entendu que l'invention s'étend à toute construction de modèle animal compatible, par exemple en remplaçant le gène codant pour HLA-A2.01 par un gène codant pour HLA-B7 etc...

15 Bien qu'à travers le mémoire descriptif de la présente invention on utilise le terme "peptide", il est entendu que l'invention ne se limite pas aux composés formés par l'union d'un nombre limité d'acides aminés. En effet, la souplesse des technologies recombinantes permet de réaliser des protéines comportant une pluralité d'épitopes identiques ou différents et susceptibles d'améliorer l'activité immunogénique du produit final. Ainsi la présente invention couvre également les polymères immunogéniques comprenant entre deux et dix peptides choisis parmi 20 les peptides mutés définis précédemment. De même, la présente invention couvre les polypeptides codant pour une séquence peptidique autre qu'une séquence R9M sauvage, ces polypeptides incorporant une ou plusieurs séquences peptidiques codant pour un peptide choisi parmi les peptides mutés définis précédemment. Enfin, la présente invention inclut les oligonucléotides ayant une 25 séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique autre qu'une séquence R9M sauvage, ces oligonucléotides incorporant un ou plusieurs polynucléotides tels que définis précédemment.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

EXEMPLES

Les exemples qui suivent servent à illustrer l'étendue d'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectuées sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puisse utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la présente invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

Exemple 1: Optimisation des peptides épitopiques de la région de fusion

10 TEL/AML1

Il est connu que l'affinité d'un peptide épitopique pour le CMH prédit en partie son potentiel immunogénique. Cette affinité peut se mesurer par sa capacité de fixation au CMH de classe I et par la stabilité conférée au complexe CMH peptide ainsi formé à la surface cellulaire en utilisant des cellules T2 tap-exprimant HLA-A*02.01.

Les inventeurs de la présente invention ont observé que le complexe R9M/HLA A2.01 à la surface des cellules T2 était peu stable. Ces constatations ont été mises en relation avec l'instabilité physico-chimique du peptide due à la présence d'une cystéine en position 5 susceptible de favoriser une oxydation et la formation de composés secondaires via le groupement SH. Des articles récents montrent que la dimérisation et la cystéinisation de peptides synthétiques contenant la cystéine surviennent *in vitro* mais aussi *in vivo* et que ces processus modifient fortement l'immunogénicité de ces peptides. La présence d'agents réducteurs ou la substitution de la cystéine par l'acide α -aminobutyrique ou la sérine accroît l'immunogénicité de ces peptides.

Des efforts répétés d'immunisation des souris transgéniques HLA A2.01 avec le peptide R9M ont montré l'inconstance et la faiblesse des réponses de CTL induites. La cystéine du peptide R9M a donc été substituée par un acide aminé neutre comme la sérine ou l'alanine, ou par l'acide α -aminobutyrique. Les résultats ci-dessus montrent que cette substitution accroît effectivement la stabilité du complexe peptide-HLA-A*02.01. La substitution de l'acide aminé en position 1 par

une tyrosine permet aussi d'accroître l'immunogénicité des peptides HLA-A*02.01 restreints.

Ces résultats préliminaires ont, par la suite, été utilisés pour optimiser davantage le peptide R9M. Les résultats qui suivent montrent la simple ou double
5 substitution en P5 par un des acides aminés neutres (alanine, sérine ou acide α -aminobutyrique) et/ou en P1 par la tyrosine accroît les capacités antigéniques de ces peptides mutés (Figure 1). Les tests de fixation réalisés *in vitro* en utilisant les molécules HLA-A2.01 solubles et des cellules T2 ont montré que la capacité de fixation et de stabilisation des molécules HLA-A2.01 était plus importante comparé
10 au peptide R9M sauvage (Tableau 2).

L'immunogénicité des peptides mutés a ensuite été étudiée chez la souris transgénique HHD (H2 classe 1-négative et transgénique pour HLA-A*02.01). Ces souris sont décrites dans *European Journal of Immunology*, 29:3112-21, 1999. Des groupes de plus de 10 souris HHD ont été immunisés par les peptides
15 synthétiques (émulsion dans IFA avec le peptide auxiliaire HBVcore128-140 tel que décrit précédemment dans Firat et coll., *Eur. J. Immunol.* 29:3112-21 (1999)).

Les souris HHD immunisées par le peptide natif R9M développent une faible réponse CTL spécifique néanmoins capable de reconnaître la lignée tumorale TEL AML⁺ (Tableau 3 et Tableau 4). Par contre, les peptides mutés
20 (ayant des substitutions simples ou doubles) induisent une activité CTL forte et une lyse des lignées tumorales TEL AML⁺ dans la majorité des cas (Tableau 3 et Tableau 4). L'immunogénicité accrue des peptides R9M mutés a ensuite été confirmée *in vitro* en utilisant des cellules mononucléées de 5 sujets sains HLA-A*02.01 (Figure 2).

Tableau 2 : Liaison des peptides dérivés de la protéine de fusion native ETV6-AMLT et de leurs molécules analogues mutés, à la molécule HLA-A2.01.

Peptide	Séquence en acide aminé	Mesure de la stabilisation		Ratio peptide/ ¹²⁵ I-F10V	
		RA ^b	DC ₅₀ (h) ^c	10/1	25/1
A9E	AMPIGRIAE	10-100	2-4	47 ^d	57
Y9E	YMPIGRIAE	>100	0	39	47
P9I	PIGRIAECl	>100	0	23	58
Y9I	YIGRIAECl	>100	<2	43	60
R9M	RIAEClLGM	2,9	<2	64	69
Y9M	<u>Y</u> IAEClLGM	>100	<2	45	66
R9M-5A	RIAE <u>A</u> ILGM	3,2	<2	59	72
Y9M-5A	<u>Y</u> IAE <u>A</u> ILGM	0,9	2-5	79	87
R9M-5S	RIAE <u>S</u> ILGM	2,2	2	74	75
Y9M-5S	<u>Y</u> IAE <u>S</u> ILGM	1,4	2-5	25	37
R9M-5 α -but ^a	RIAE <u>α-but</u> ILGM	2	2	27	49
Y9M-5 α -but ^a	<u>Y</u> IAE <u>α-but</u> ILGM	0,7	2-5	26	26
HIV 1 rt.476	ILKEPVHGV	1	5	NT	NT
F10V	FLPSDYFPSV	NT	NT	63	84

5 ^{a)} Substitution du résidu cystéine par l'acide α -amino butyrique.

^{b)} RA représente le ratio des concentrations nécessaires des échantillons testés versus le peptide en référence pour atteindre 20% du nombre maximal de molécules stabilisées tel que défini avec de fortes concentrations du peptide en référence.

10 ^{c)} Demi-vie (DC₅₀) des complexes stabilisés peptide-HLA-A2.1 mesurée suivant une incubation pendant une nuit des cellules T2 et du peptide en référence. Obtenu en mesurant par immunofluorescence indirecte et une analyse FACS la surface cellulaire résiduelle des complexes peptide-HLA-A2.01 à différents intervalles (0, 2, 4 et 5 h).

^{d)} Représente le pourcentage d'inhibition de la liaison du peptide du virus de l'hépatite BHBVc.18-27 (F10V).

Tableau 3 : Étude comparative de la réponse secondaire des cellules CTL provenant de souris HHD immunisées avec le peptide R9M sauvage ou les peptides R9M mutés.

Effecteurs	Cellules RMA-S-HHD stimulées avec le peptide muté ^b R/T (% de lyse nette)	^a Cellules RMA-S-HHD stimulées avec le peptide R9M sauvage ^b R/T (% de lyse nette)
R9M	1/18 (13)	-
R9M-5A	2/10 (40,43)	2/10 (22,28)
Y9M-5A	8/10 (27,44,51,62,65,65,66,77)	7/10 (11,14,18,19,34,46,50)
R9M-5S	11/14 (15,20,24,29,37,37,39,43,64,66,72)	6/14 (11,11,17,50)
Y9M-5S	9/10 (26,35,49,52,53,57,64,65,68)	3/10 (14,43,45)
R9M-5 α -but	7/10 (14,15,30,43,52,71,75)	5/10 (18,32,44,58,64)
Y9M-5 α -but	8/10 (15,45,57,58,60,62,65,67)	8/10 (21,29,38,46,54,54,56)

a) Des cellules de la rate de souris co-injectées s.c. avec le peptide sauvage RM9 et ses analogues mutés et le peptide auxiliaire HBVc.128 dans IFA onze (11) jours auparavant, furent restimulées *in vitro* avec les différents peptides. Six (6) jours plus tard celles-ci furent évaluées à différents ratios E/T contre des cellules-cibles RMA-S-HHD possédant les différents peptides en référence ou un peptide-contrôle (Inf.m.58).

b) R/T représente les souris-répondeurs versus le total des souris testées. Les souris furent considérées comme ayant répondu lorsqu'au moins 10% de lyse spécifique fut observée. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la lyse maximale observée pour chaque souris-répondeur à un ratio E/T 60:1.

Tableau 4 : Étude comparative de la réponse tertiaire de cellules CTL de souris HHD immunisées avec le peptide R9M sauvage ou les peptides R9M mutés.

Effecteurs	Cellules RMA-S-HHD stimulées avec le peptide muté ^b R/T (% de lyse nette)	^a Cellules TEL/AML ⁺ EL4-HHD ^b R/T (% de lyse nette)
R9M	2/10 (13,25)	5/10 (15,15,22,30,33)
R9M-5A	1/10 (20)	6/10 (17,27,32,38,43,58)
Y9M-5A	9/10 (10,40,44,51,62,65,65,66,77)	5/10 (15,24,24,32,34)
R9M-5S	6/10 (20,29,39,43,64,72)	11/14 (12,14,15,20,24,29,31,32,34,36,56)
Y9M-5S	9/10 (16,26,35,52,53,57,64,65,68)	6/10 (13,17,22,25,32,60)
R9M-5 α -but	8/10 (12,25,14,15,30,43,71,75)	7/10 (11,15,25,26,31,33,43)
Y9M-5 α -but	8/10 (18,45,65,65,68,69,69,75)	10/10 (11,22,28,28,31,36,39,59,69)

a) Des cellules de la rate de souris co-injectées s.c. avec le peptide sauvage RM9 et ses analogues mutés et le peptide auxiliaire HBVc.128 dans IFA onze (11) jours auparavant, furent restimulées à deux (2) reprises *in vitro* avec des trophoblastes-LPS possédant les peptides en référence. Les cellules furent évaluées six (6) jours plus tard à différents ratios E/T contre des cellules-cibles RMA-S-HHD possédant les différents peptides en référence ou un peptide-contrôle (Inf.m.58) ou contre des cellules EL4-HHD exprimant ou non le gène *tel/aml*.

b) R/T représente les souris-répondeurs versus le total des souris testées. Les souris furent considérées comme ayant répondu lorsqu'au moins 10% de lyse spécifique fut observée. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la lyse maximale observée pour chaque souris-répondeur à un ratio E/T 60:1.

Exemple 2: Élaboration d'un model tumoral chez la souris HHD

L'induction d'une réponse CTL forte *in vivo* ne reflète pas toujours la capacité protectrice de cette réponse immune contre les cellules tumorales. Ainsi, la lignée tumorale EL4 S3-Rob (β 2-microglobuline murine négative) dérivée de souris C57Bl/6 et de même fond génétique que les souris HHD, a été doublement transfectée par la molécule HHD et le gène de TEL/AML1. Après passages successifs, d'abord chez des souris *nude*, puis chez des souris HHD, les inventeurs ont obtenu une lignée fortement tumorigène chez la souris HHD. L'injection de ces cellules tumorales chez des groupes de 8 souris HHD préalablement immunisées avec le peptide R9M sauvage ou des peptides R9M mutés a montré que seuls ces derniers, en particulier R9M-5A, R9M-5 α -butyrique et R9M-5S étaient capables de ralentir le développement de tumeurs (Figure 3) et de prolonger la survie des souris (Figure 4). Chez certaines souris, les inventeurs ont observé une protection totale.

Conclusion

L'identification de peptides épitopiques uniquement exprimés par des cellules leucémiques t(12;21) rend envisageable une approche immuno-thérapeutique chez des patients. La présente invention rend disponible des méthodes et du matériel biologiques permettant l'évaluation de préparations vaccinales (modèle animal humanisé pour la réponse cytotoxique CD8 restreinte, modèle tumoral, série de peptides optimisés).

Différentes stratégies d'immunisation de souris HHD utilisant l'épitope R9M natif et ses analogues mutés permettront d'optimiser encore plus la présente invention afin d'induire une réponse forte et durable et conférer une protection efficace sans effets secondaires. En utilisant une stratégie biphasique (phase exploratoire murine, phase de validation humaine), il sera possible de présélectionner rapidement les formulations vaccinales proposées en clinique. Les meilleurs peptides R9M mutés pourront être testés à la fois seuls et en association dans différents vecteurs vaccinaux.

L'approche d'immunothérapie passive consistant à réinjecter aux patients des CTL induits *in vitro* pourra aussi être évaluée chez des souris HHD porteuses de tumeur EL4-S3-Rob-HHD exprimant la protéine de fusion TEL-AML1.

5 L'efficacité des cellules dendritiques chargées par des peptides ou transduites de manière stable pourrait aussi être étudiée puisque ces cellules sont actuellement utilisées dans différentes pathologies tumorales humaines et semblent être efficaces dans certains cas.

10 Le potentiel immunogénique des polynucléotides codant pour les peptides R9M mutés pourra aussi être évalué, que ce soit par des injections d'ADN nu ou par l'utilisation de vecteurs. En effet, il est connu que les vecteurs chimiques ou viraux permettent, par un meilleur ciblage cellulaire et une prolongation de la présentation antigénique, d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire. Plusieurs vecteurs pourraient donc être utilisés en tant que vecteurs vaccinaux. Parmi les vecteurs que l'on pourrait utiliser, il y a ceux récemment développés à 15 l'Institut Pasteur, soient:

- i) le vecteur pCMV-B10 codant des glycoprotéines recombinantes du virus de l'Hépatite B dont les effets immunothérapeutiques dans le traitement d'affections cancéreuses ont déjà été établis;
- 20 ii) le vecteur Rougeole recombinant générateur de réponses immunitaires fortes chez les individus non déjà immuns contre la rougeole;
- 25 iii) les vecteurs lentiviraux à triplex qui induisent chez la souris des réponses CTL initiales et mémoire très efficaces et qui sont des plus performants pour induire des réponses humaines *in vitro* après stimulation par des cellules dendritiques;
- iv) le vecteur ALVAC™ recombinant développé par Aventis-Pasteur; et
- v) les lipopeptides qui sont actuellement utilisés en France dans plusieurs essais cliniques.

30 Bien que la présente invention ait été décrite par rapport aux réalisations concrètes et privilégiées, il apparaîtra toutefois évident aux personnes versées dans l'art ou la science en cause qu'il est possible d'introduire un certain nombre

de variations et modifications sans déroger à la portée de l'invention décrite dans ce document.

REVENDEICATIONS:

1. Peptide immunogénique muté, caractérisé en ce qu'il dérive de la protéine humaine de fusion TEL/AML1 comprenant la séquence peptidique R9M sauvage (Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met), et en ce qu'il est muté
5 dans ladite séquence peptidique R9M.
2. Le peptide immunogénique de la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence peptidique d'au moins neuf (9) acides aminés consécutifs, ladite séquence d'au moins neuf (9) acides aminés
10 étant dérivée substantiellement de ladite séquence peptidique R9M sauvage.
3. Le peptide immunogénique de la revendication 1 ou 2, caractérisé
15 en ce qu'il ralentit la croissance de cellules tumorales lymphoblastiques après administration à un patient leucémique.
4. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il induit une réponse immunitaire
20 contre le développement de cellules tumorales lymphoblastiques après administration à un receveur.
5. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que après son administration à un
25 patient leucémique, il déclenche une réponse immunitaire *in vivo* contre les cellules leucémiques de type LAL-B commune avec t(12;21) dudit patient.
6. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que après son administration à un
30 patient leucémique, il déclenche une réponse cytotoxique *in vivo* contre les cellules leucémiques de type LAL-B commune avec t(12;21) dudit patient.

7. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il déclenche une réponse immunitaire *in vitro* contre les cellules leucémiques de type LAL-B commune avec t(12;21) isolées d'un patient leucémique.
8. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il déclenche une réponse cytotoxique *in vitro* contre les cellules leucémiques de type LAL-B commune avec t(12;21) isolées d'un patient leucémique.
9. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il présente une haute affinité pour la molécule HLA-A2.01, et en ce qu'il forme avec ladite molécule HLA-A2 un complexe stable.
10. Le peptide immunogénique de la revendication 9, caractérisé en ce que ledit complexe possède une demi-vie le rendant capable d'induire *in vivo* ou *in vitro* une réponse immunitaire cytotoxique.
11. Le peptide immunogénique de la revendication 10, caractérisé en ce que ledit complexe possède une demi-vie comprise entre 0.9 et 5 heures.
12. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'acide aminé cystéine en position 5 de ladite séquence peptidique R9M sauvage est substitué par un acide aminé neutre, notamment choisi parmi la sérine, l'alanine et l'acide α -aminobutyrique.
13. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'acide aminé arginine en

position 1 de ladite séquence peptidique R9M sauvage est substitué par un acide aminé aromatique, notamment par la tyrosine.

14. Le peptide immunogénique selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que les acides aminés en position 1 et 5 de ladite séquence peptidique R9M sauvage sont tous deux substitués.

15. Le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence peptidique choisie dans le groupe constitué par : RIAESILGM, RIAEAILGM, RIAE α -butlLGM, YIAESILGM, YIAEAILGM, et YIAE α -butlLGM.

16. Polynucléotide codant pour un peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

17. Médicament comprenant au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par :

- le peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15;
- le polynucléotide de la revendication 16; et
- des cellules-T lytiques sensibilisées *in vitro* par la mise en contact d'un peptide immunogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

25

18. Le médicament de la revendication 17, caractérisé en ce que au moins une portion des peptides immunogéniques comprise dans ledit médicament est conjuguée à un support sur lequel lesdits peptides sont absorbés ou fixés de façon covalente ou non-covalente.

30

19. Le médicament de la revendication 18, caractérisé en ce que le support est choisi dans le groupe constitué par les vésicules lipidiques, les microsphères, les billes de latex, les billes de polystyrène et les protéines.
- 5 20. Le médicament selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, pour la vaccination thérapeutique et/ou la vaccination préventive de la leucémie chez l'homme.
- 10 21. Le médicament de la revendication 20, caractérisé en ce que la leucémie est la leucémie aiguë lymphoblastique LAL-B commune avec t(12;21).
- 15 22. Composition thérapeutique comprenant un médicament selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, et un véhicule pharmaceutique acceptable.
- 20 23. Composition thérapeutique selon la revendication 22, pour le traitement ou la prévention de la leucémie aiguë lymphoblastique B commune avec t(12;21) chez l'humain.
- 25 24. Utilisation d'au moins un peptide immunogénique sélectionné parmi les peptides définis dans les revendications 1 à 15 et/ou d'au moins un polynucléotide tel que défini à la revendication 16, comme agent antitumoral ou pour la préparation d'un vaccin antitumoral.
- 30 25. Procédé de stimulation *in vitro* de la réponse immunitaire chez l'homme, comprenant la séparation des cellules lymphoïdes ou non de l'homme et l'incubation *in vitro* desdites cellules en présence d'au moins un peptide immunogénique sélectionné parmi les peptides définis dans les revendications 1 à 15 et/ou en présence d'au moins un polynucléotide

selon la revendication 16, lesdites cellules permettant d'induire d'une réponse cytotoxique *in vitro*.

26. Procédé de stimulation *in vivo* de la réponse immunitaire chez l'homme, comprenant l'administration à un patient:

- soit des cellules cytotoxiques T CD8 issues de l'incubation *in vitro* des cellules lymphoïdes ou non stimulées *in vitro* selon le procédé de la revendication 25;
- soit des cellules lymphoïdes ou non stimulées *in vitro* selon le procédé de la revendication 25.

27. Anticorps purifié polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il se fixe sur au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

15

28. Utilisation d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon la revendication 27 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique LAL-B commune avec t(12;21).

20

29. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 27 ou 28 avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

25 30. Vecteur d'expression cellulaire, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'acide nucléique exprimant un peptide immunogénique tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

31. Procédé de préparation d'un peptide immunogénique tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, comprenant la transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression

30

cellulaire tel que défini à la revendication 30, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du peptide dans le milieu de culture.

- 5 32. Cellule tumorale caractérisée en ce qu'elle est obtenue par double transfection de souris EL4 S3-Rob (β 2-microglobuline murine négative) avec:
- 1) le gène humain codant la molécule HHD; et
- 2) le gène humain codant pour la protéine de fusion TEL/AML1
- 10 comprenant :
- a) la séquence peptidique R9M sauvage (Arg-Ile-Ala-Glu-Cys-Ile-Leu-Gly-Met); ou
- b) une séquence peptidique R9M mutée codant pour un peptide immunogénique muté tel que défini selon l'une quelconque des
- 15 revendications 1 à 15.
33. Procédé de sélection de molécules thérapeutiques pouvant induire une réponse immunitaire protectrice *in vivo* contre des peptides sauvages tumoraux, viraux, bactériens, ou fongiques, caractérisé en ce que:
- 20 c) on administre à un modèle animal une lignée cellulaire tumorale EL4S3-rob doublement transfectée par des séquences nucléotidiques codant pour la molécule HHD et des séquences nucléotidiques codant pour lesdits peptides sauvages tumoraux, viraux, bactériens ou fongiques, ledit modèle animal ayant un génotype compatible avec
- 25 celui de ladite cellule tumorale transfectée et ayant été préalablement immunisé avec lesdites molécules que l'on cherche à sélectionner;
- d) on compare la capacité desdites cellules transfectées d'induire une réponse *in vivo* contre les épitopes desdits peptides tumoraux, viraux bactériens, fongiques avec la capacité desdits peptides sauvages
- 30 tumoraux, viraux, bactériens, ou fongiques d'induire une réponse *in vivo* contre les épitopes desdits peptides sauvages chez un modèle

animal soumis à une immunisation préalable avec les séquences peptidiques sauvages desdites molécules thérapeutiques.

34. Un polymère immunogénique comprenant entre deux et dix peptides
5 choisis parmi les peptides définis aux revendications 1 à 15.
35. Un polypeptide codant pour une séquence peptidique autre qu'une
séquence R9M sauvage, ledit polypeptide incorporant une ou plusieurs
séquences peptidiques codant pour un peptide choisi parmi les peptides
10 définis aux revendications 1 à 15.
36. Un oligonucléotide ayant une séquence nucléotidique codant pour
une séquence peptidique autre qu'une séquence R9M sauvage, ledit
oligonucléotide incorporant un ou plusieurs polynucléotides selon la
15 revendication 16.

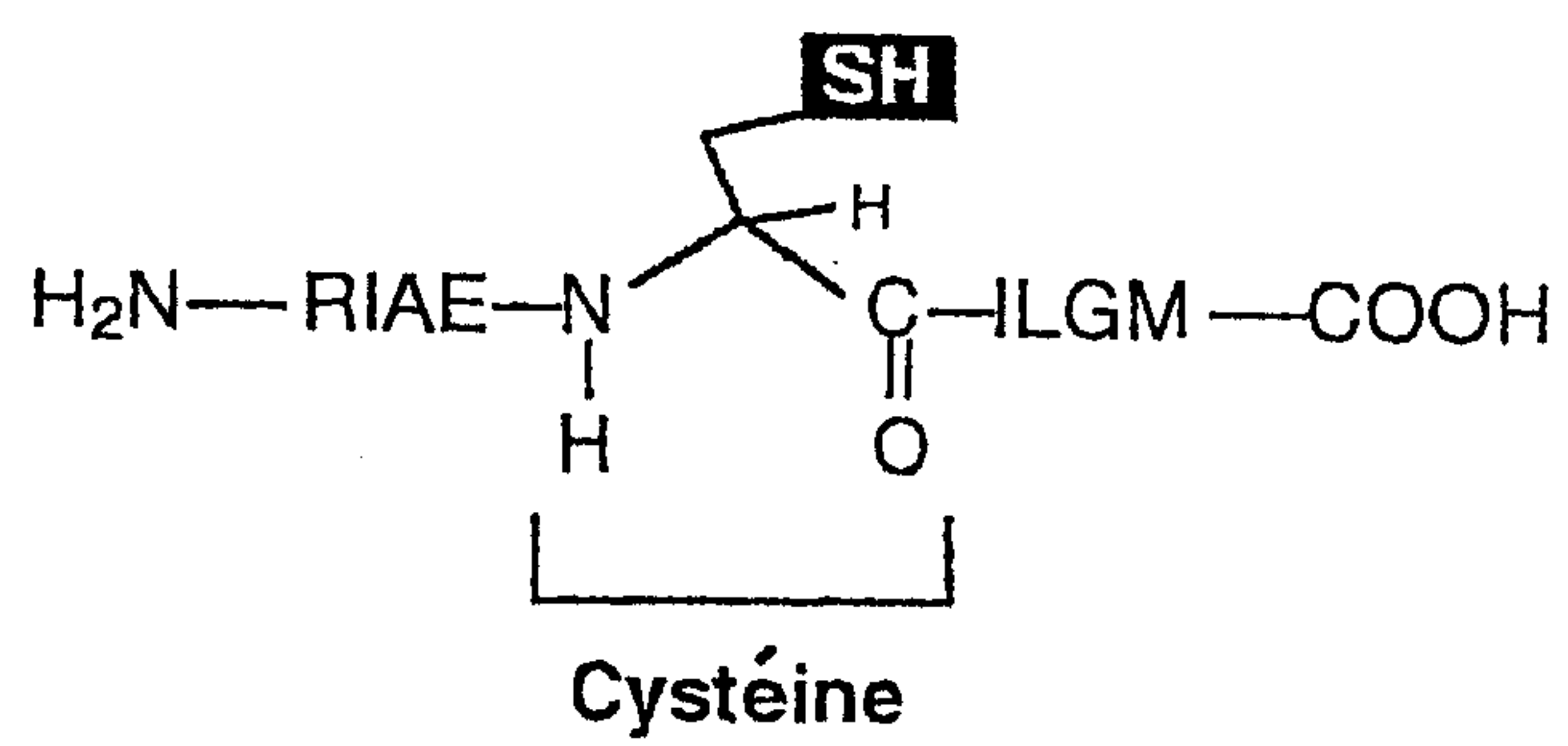
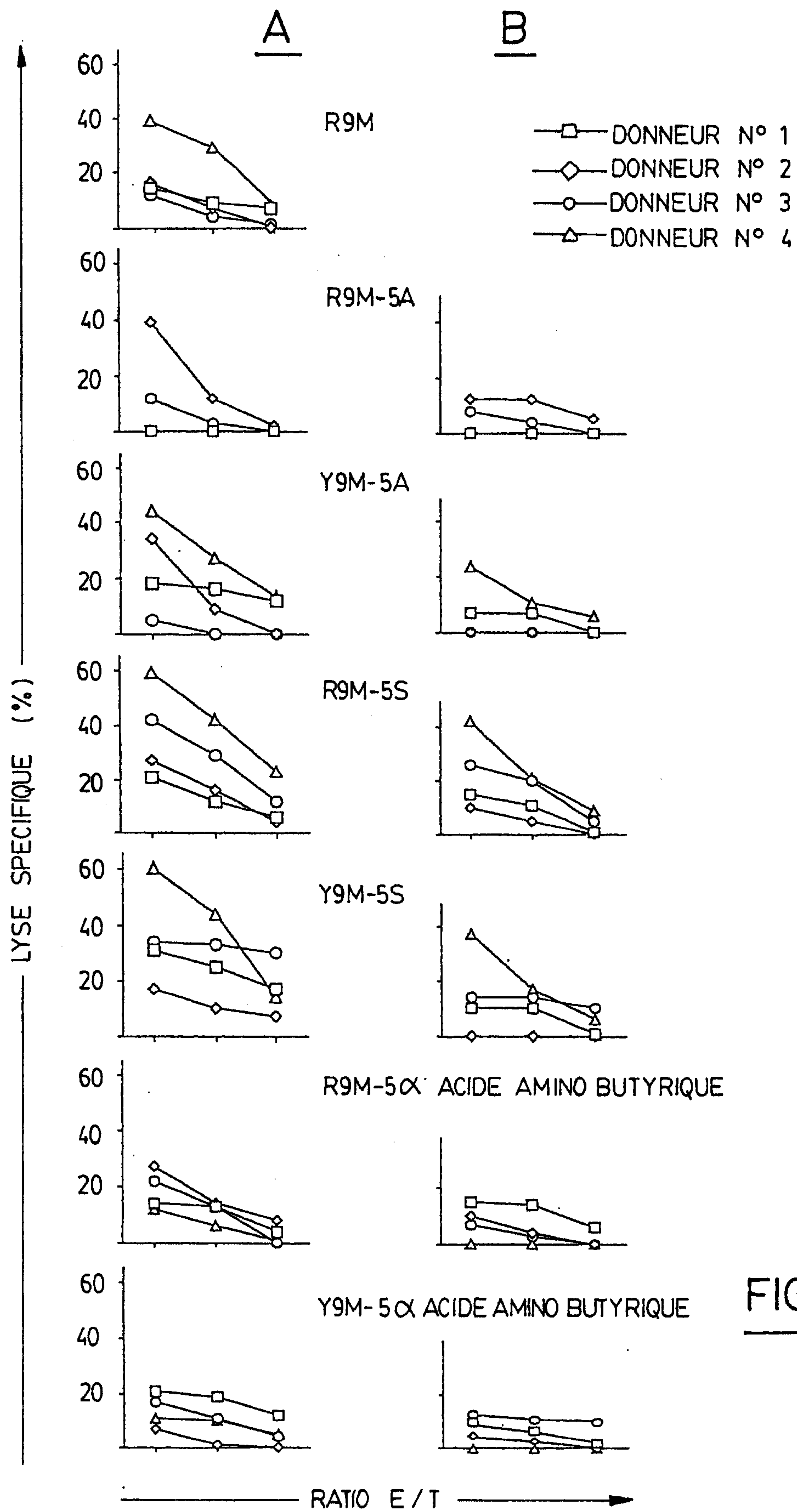


FIG. 1

**FIG. 2**

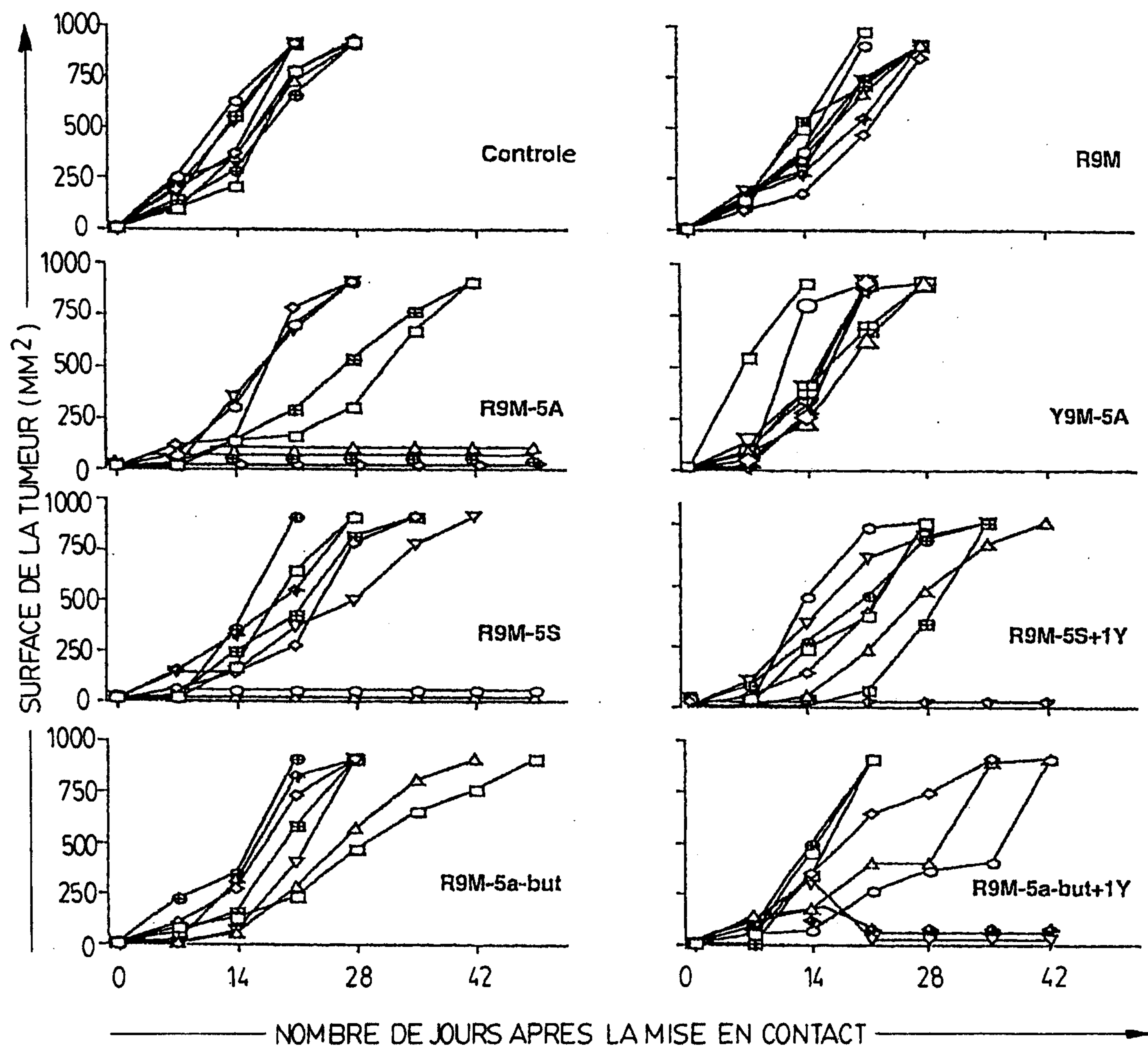
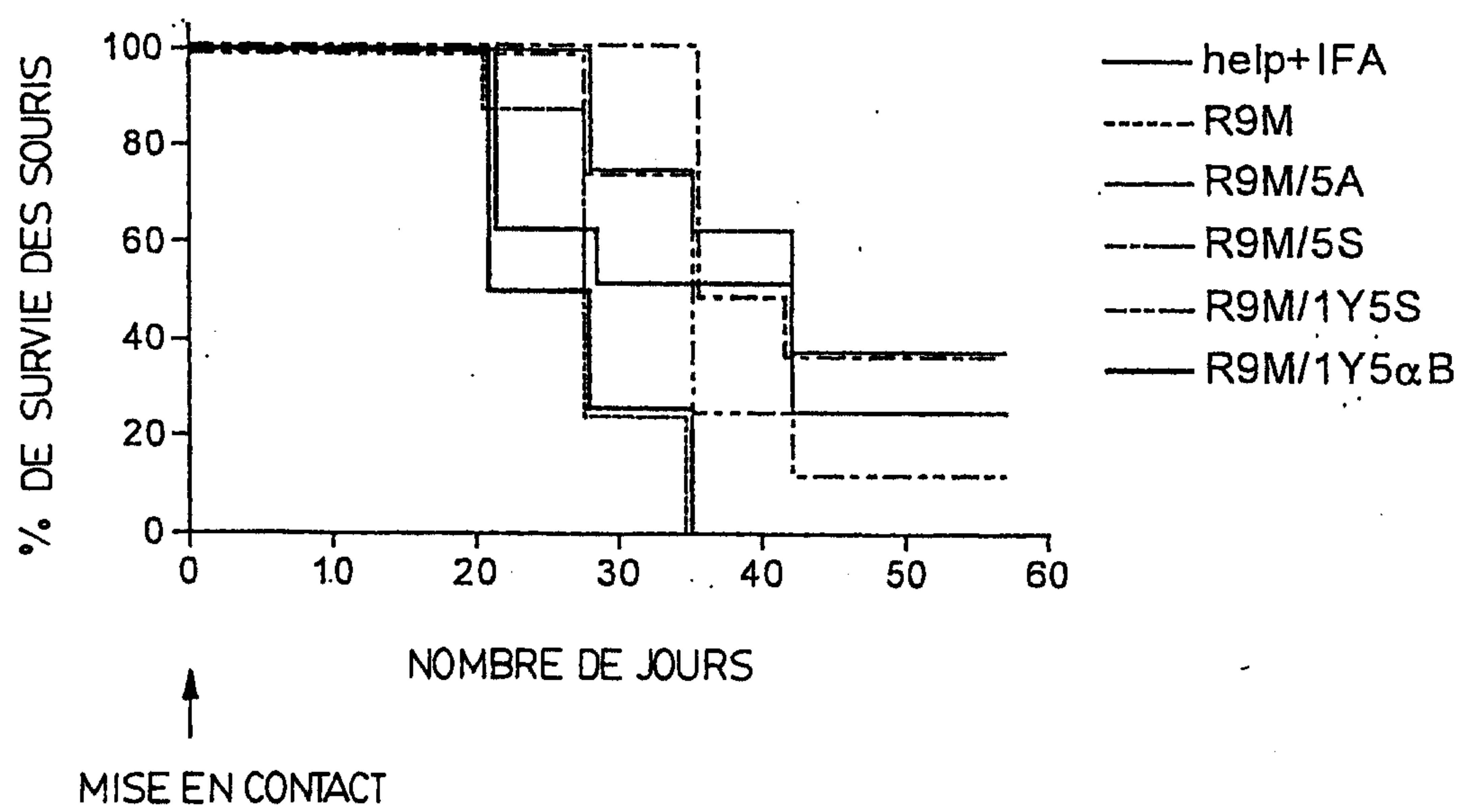


FIG. 3

FIG. 4