



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2003/03/27
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2003/10/09
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/10/16
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2004/09/27
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2003/000970
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2003/083124
(30) Priorité/Priority: 2002/03/28 (FR02/03888)

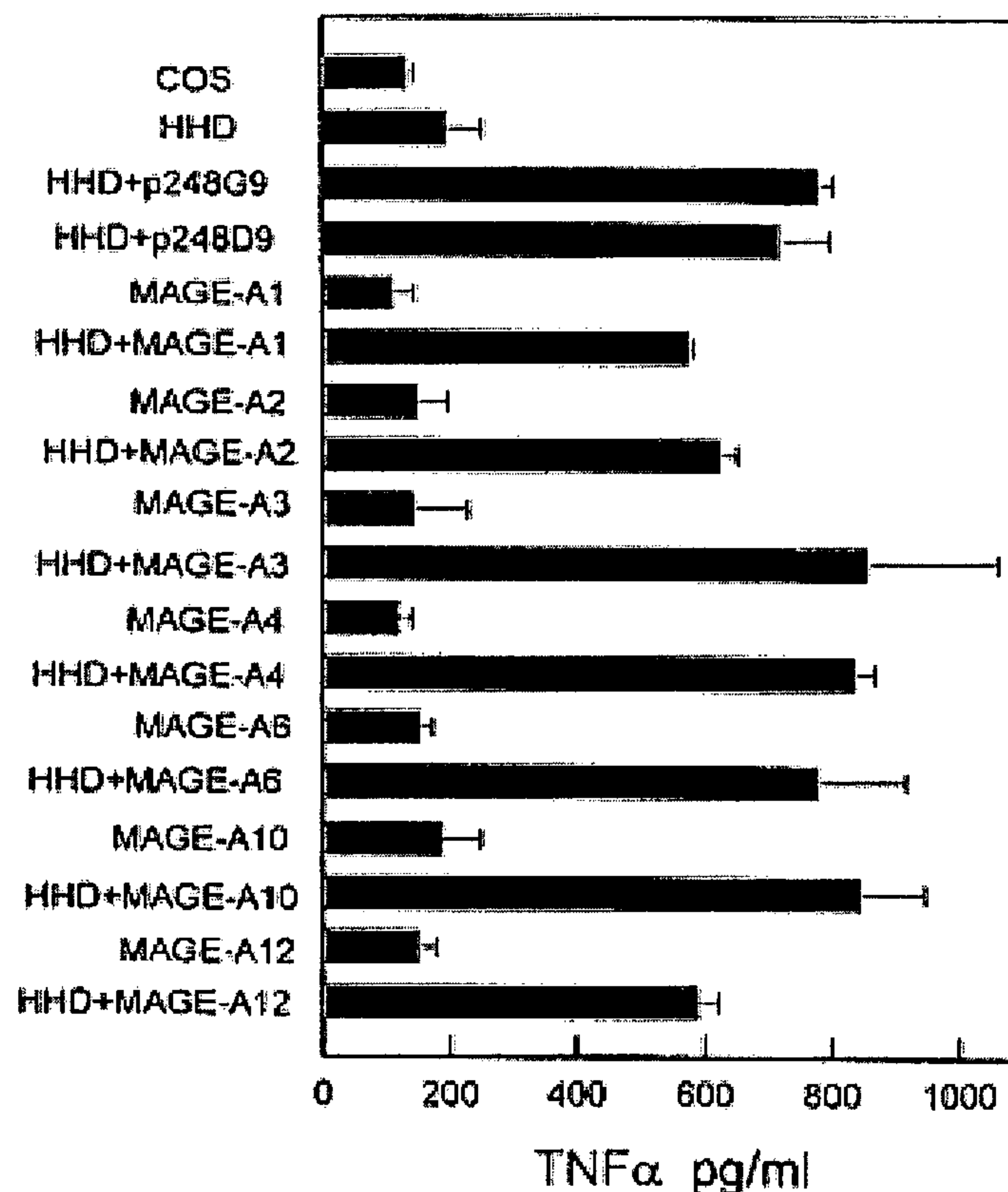
(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/82* (2006.01),
A61K 38/08 (2006.01), *A61K 39/00* (2006.01),
A61P 35/00 (2006.01), *A61P 37/04* (2006.01),
C07K 14/47 (2006.01), *C07K 14/705* (2006.01),
C07K 7/06 (2006.01), *C12N 15/12* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
KOSMATOPOULOS, KOSTAS, FR;
GRAFF-DUBOIS, STEPHANIE, FR

(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : EPITOPES PEPTIDIQUES COMMUNS A DES ANTIGENES D'UNE MEME FAMILLE MULTIGENIQUE
(54) Title: PEPTIDE EPITOPES COMMON TO ANTIGENS OF THE SAME MULTIGENE FAMILY



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention est relative à l'obtention d'épitopes peptidiques communs à plusieurs antigènes d'une même famille multigénique, ces épitopes possédant au moins une séquence pentapeptidique commune précédée par 3 acides aminés à l'extrémité N-terminale, et éventuellement suivie par 1 ou 2 acides aminés à l'extrémité C-terminale. L'invention concerne également des polynucléotides codant pour ces épitopes. Lesdits peptides et polynucléotides sont utilisables notamment en immunothérapie anti-tumorale.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
9 octobre 2003 (09.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/083124 A3(51) Classification internationale des brevets⁷ :**G01N 33/68, C07K**

7/06, G01N 33/574, C07K 14/82, 14/47

Desmoulins, F-94800 Villejuif (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/000970

(72) Inventeurs; et

(22) Date de dépôt international : 27 mars 2003 (27.03.2003)

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **KOS-MATOPOULOS, Kostas** [FR/FR]; 70, rue du Javelot, F-75013 Paris (FR). **GRAFF-DUBOIS, Stéphanie** [FR/FR]; 2, rue Duchefdelaville, F-75013 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.; Cabinet Ores, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(30) Données relatives à la priorité :

02/03888

28 mars 2002 (28.03.2002)

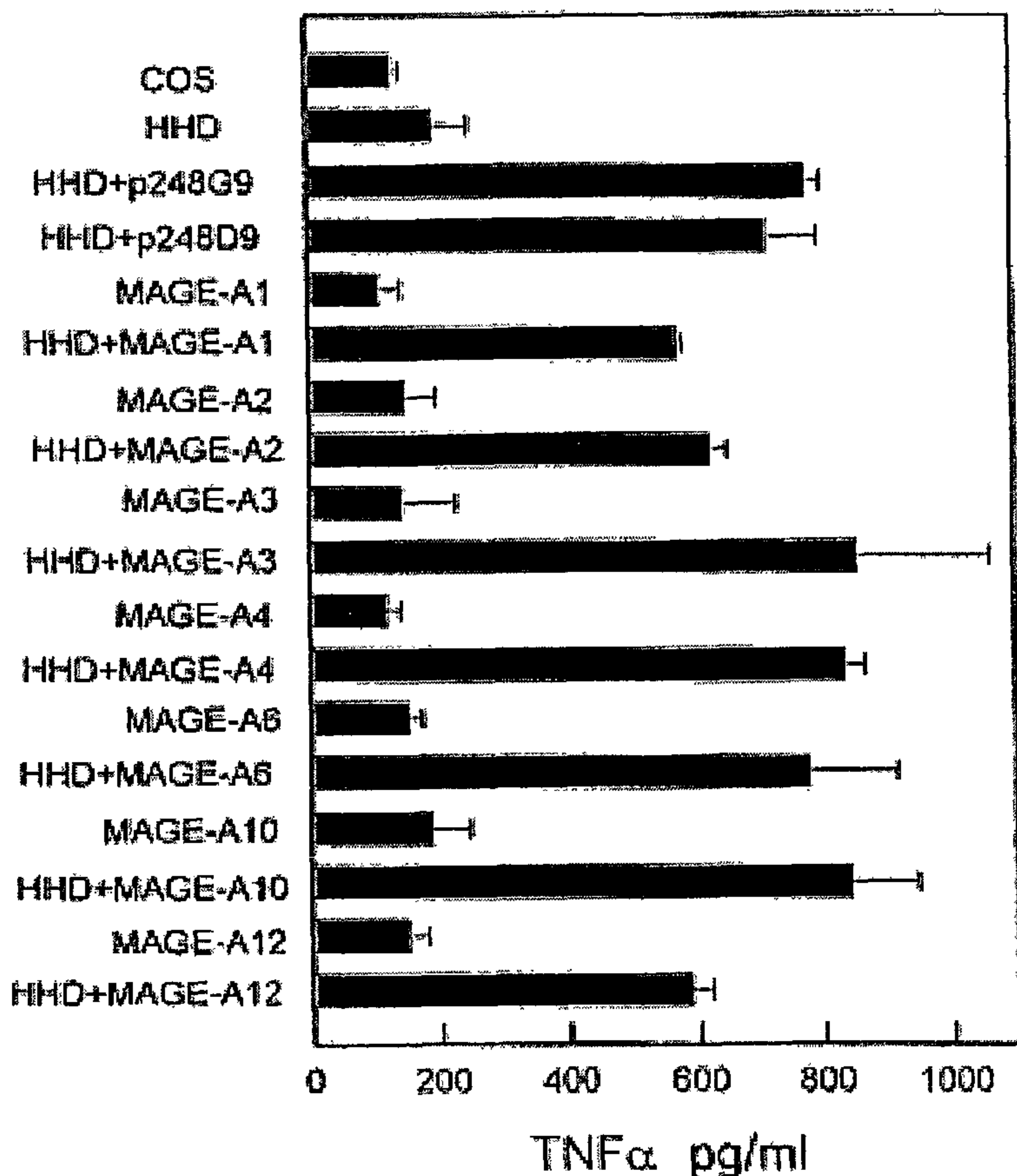
FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : **INSTITUT GUSTAVE ROUSSY** [FR/FR]; 39, rue Camille(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: PEPTIDE EPTOPES COMMON TO ANTIGENS OF THE SAME MULTIGENE FAMILY

(54) Titre : EPITOPES PEPTIDIQUES COMMUNS A DES ANTIGENES D'UNE MEME FAMILLE MULTIGENIQUE



(57) Abstract: The invention relates to the production of peptide epitopes common to a plurality of antigens of the same multigene family, said epitopes containing at least one common pentapeptide sequence preceded by three amino acids at the N-terminal end and optionally followed by one or two amino acids at the C-terminal end. The invention also relates to polynucleotides coding for said epitopes. Said peptides and polynucleotides can be especially used in anti-tumour immunotherapy.

(57) Abrégé : L'invention est relative à l'obtention d'épitopes peptidiques communs à plusieurs antigènes d'une même famille multigénique, ces épitopes possédant au moins une séquence pentapeptidique commune précédée par 3 acides aminés à l'extrémité N-terminale, et éventuellement suivie par 1 ou 2 acides aminés à l'extrémité C-terminale. L'invention concerne également des polynucléotides codant pour ces épitopes. Lesdits peptides et polynucléotides sont utilisables notamment en immunothérapie anti-tumorale.

WO 2003/083124 A3

WO 2003/083124 A3



HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

1 avril 2004

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**EPITOPES PEPTIDIQUES COMMUNS A DES ANTIGENES D'UNE MEME
FAMILLE MULTIGENIQUE**

La présente invention est relative à des peptides représentant des épitopes partagés d'antigènes tumoraux, et à
5 leur utilisation en immunothérapie.

La vaccination ou immunothérapie peptidique est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des cancers. Son principe repose sur l'immunisation par des
10 peptides reproduisant des épitopes T d'antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses exprimant ces antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTL ne reconnaissent pas
15 les antigènes protéiques entiers, mais des fragments peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Ce sont ces fragments peptidiques qui constituent les épitopes T. Les peptides
20 présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+, qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les peptides
25 présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont reconnus par les cellules T CD4+.

L'identification de ces épitopes, et notamment (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8+ dans la cytotoxicité) de ceux présentés par le CMH I, constitue donc
30 une étape essentielle pour le développement de compositions d'immunothérapie anti-tumorale.

De nombreux antigènes tumoraux sont connus à l'heure actuelle ; certains des épitopes T de ces antigènes ont été identifiés, et l'efficacité de vaccins à base de
35 peptides reproduisant ces épitopes T a été montrée dans de nombreux cas.

Cependant, l'expression de la majorité des antigènes tumoraux est restreinte à certains types

histologiques de tumeurs, ce qui limite leur utilisation clinique.

Une autre limitation importante de l'immunothérapie peptidique résulte de l'apparition chez
5 certains patients, de variants de la tumeur (variants d'échappement) qui n'expriment plus l'antigène reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques.

Certains antigènes tumoraux appartiennent à des familles multigéniques : à l'intérieur d'une même famille
10 existe une homologie de séquence, qui peut se traduire par l'existence d'épitopes partagés, communs à deux ou plusieurs membres d'une même famille.

Généralement, différents membres d'une même famille d'antigènes sont exprimés dans différents types de
15 tumeurs ; l'utilisation d'un épitope partagé par ces antigènes pourrait permettre d'obtenir des vaccins anti-tumoraux à large spectre d'activité.

Par ailleurs, dans de nombreux cas, plusieurs antigènes de la même famille sont co-exprimés dans une même
20 lignée tumorale ; la probabilité de perte de l'expression de l'ensemble de ces antigènes étant extrêmement faible, l'utilisation d'un épitope partagé par ces antigènes peut permettre d'éviter l'apparition de variants d'échappement.

Parmi les antigènes tumoraux connus pour
25 appartenir à une famille multigénique, on citera notamment les antigènes des familles MAGE-A, HER, BAGE, ou GAGE.

MAGE-A est une famille multigénique constituée de 12 gènes homologues (MAGE-A1 à A12) localisés dans la région q28 du chromosome X (DE PLAEN et al., Immunogenetics. 40,
30 360, 1994). Parmi les membres de cette famille, MAGE-A1, -A2, - A3, - A4, - A6, - A10 et - A12 sont exprimés fortement par les tumeurs mais pas par les tissus normaux, à l'exception des testicules et du placenta.

Les antigènes MAGE-A 1, 2, 3, 4, 6 et 12 sont
35 présents dans un large spectre de tumeurs d'origine histologique très variée comme les mélanomes, les cancers du poumon, les cancers du sein, les tumeurs tête et cou, et les sarcomes, les myélomes, etc... (BRASSEUR et al., Int. J.

Cancer, 52, 839, 1992 ; BRASSEUR *et al.*, Int. J. Cancer, 63, 375, 1995 ; PELLAT-DECEUNYNCK *et al.*, Eur. J. Immunol., 30, 803, 2000 ; OFUJI *et al.*, Anticancer Res., 18, 3639, 1998 ; GIBBS *et al.*, Melanoma Res., 10, 259, 2000 ; PATARD *et al.*,
5 Int. J. Cancer, 64, 60, 1995 ; OTTE *et al.*, Cancer Res., 61, 6682, 2001 ; SUDO *et al.*, J. Orthop. Res., 15, 128, 1997 ; LEE, *et al.*, Acta. Otolaryngol., 116, 633, 1996 ; HASEGAWA *et al.*, Arch. Pathol. Lab. Med., 122, 551, 1998 ; YAMANAKA *et al.*, Int. J. Mol. Med., 2, 57, 1998 ; GILLESPIE *et al.*, Br.
10 J. Cancer., 78, 816, 1998 ; TAHARA *et al.*, Cancer, 85, 1234, 1999).

L'expression de chaque antigène MAGE-A peut varier d'une tumeur à l'autre, mais globalement, la grande majorité des tumeurs exprime au moins un antigène MAGE-A.

15 Les protéines de la famille HER sont également exprimées par un grand nombre de tumeurs d'origine variée telles que la tumeur du sein, de l'ovaire, de la vessie, du colon, etc. (J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2000, 126, 205 ; Clin. Cancer Res. 1999, 5, 4164 ; Clin. Cancer Res. 1999, 5,
20 3653 ; J. Cell Biochem. 1999, 73, 522 ; Br. J. Cancer 1994, 70, 459 ; Cancer Res. 2000, 60, 1483 ; Clin. Cancer Res. 2001, 7, 1957 ; Adv. Cancer Res. 1997, 71, 343 ; Stem cells, 1997, 15, 1 ; Science 1987, 235, 177 ; Cancer Res. 1990, 50, 4087).

25 Malgré l'intérêt potentiel de l'utilisation d'épitopes T partagés, cette approche n'a été que très rarement proposée. On citera les résultats de TANZARELLA *et al.* (Cancer Res., 59, 2668-74, 1999), qui décrivent un peptide de séquence REPVTKAEML (SEQ ID No : 38), constituant
30 un épitope commun à plusieurs antigènes de la famille MAGE-A (MAGE-A 1, 2, 3 et 6) et se liant à l'allèle HLA-B*3701 du CMH-I.

Le premier obstacle à la mise en évidence d'autres peptides constituant des épitopes communs à
35 plusieurs antigènes tumoraux d'une même famille, est la rareté des régions de taille appropriée (au moins 8 acides aminés pour un peptide présenté par le CMH I) totalement identiques d'un antigène à l'autre.

Pour surmonter cet obstacle, les Inventeurs ont eu l'idée de rechercher si des peptides présentant un pourcentage plus faible d'identité pouvaient posséder une spécificité antigénique commune, et ont trouvé qu'il suffisait d'une
5 identité limitée à la séquence de 5 acides aminés s'étendant des positions P4 à P8 du peptide.

On définit ici comme « séquence s'étendant des positions P4 à P8 » la séquence commençant par l'acide aminé situé en position 4 à compter de l'extrémité N-terminale du
10 peptide, et se terminant par l'acide aminé situé en position 8 à compter de l'extrémité N-terminale du peptide.

La présente invention a en conséquence pour objet un procédé d'obtention de peptides représentant des épitopes peptidiques présentés par une molécule HLA de classe I et
15 partagés par au moins deux antigènes d'une même famille multigénique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a) l'alignement des séquences desdits antigènes pour identifier, sur chacun d'entre eux, une séquence de 8 à
20 10 acides aminés possédant les caractéristiques suivantes :

- elles comprennent au moins une séquence pentapeptidique commune s'étendant des positions P₄ à P₈ ;

- au moins deux desdites séquences diffèrent entre elles par au moins un acide aminé positionné en dehors de
25 ladite séquence pentapeptidique ;

b) la préparation des peptides répondant aux séquences identifiées à l'étape a).

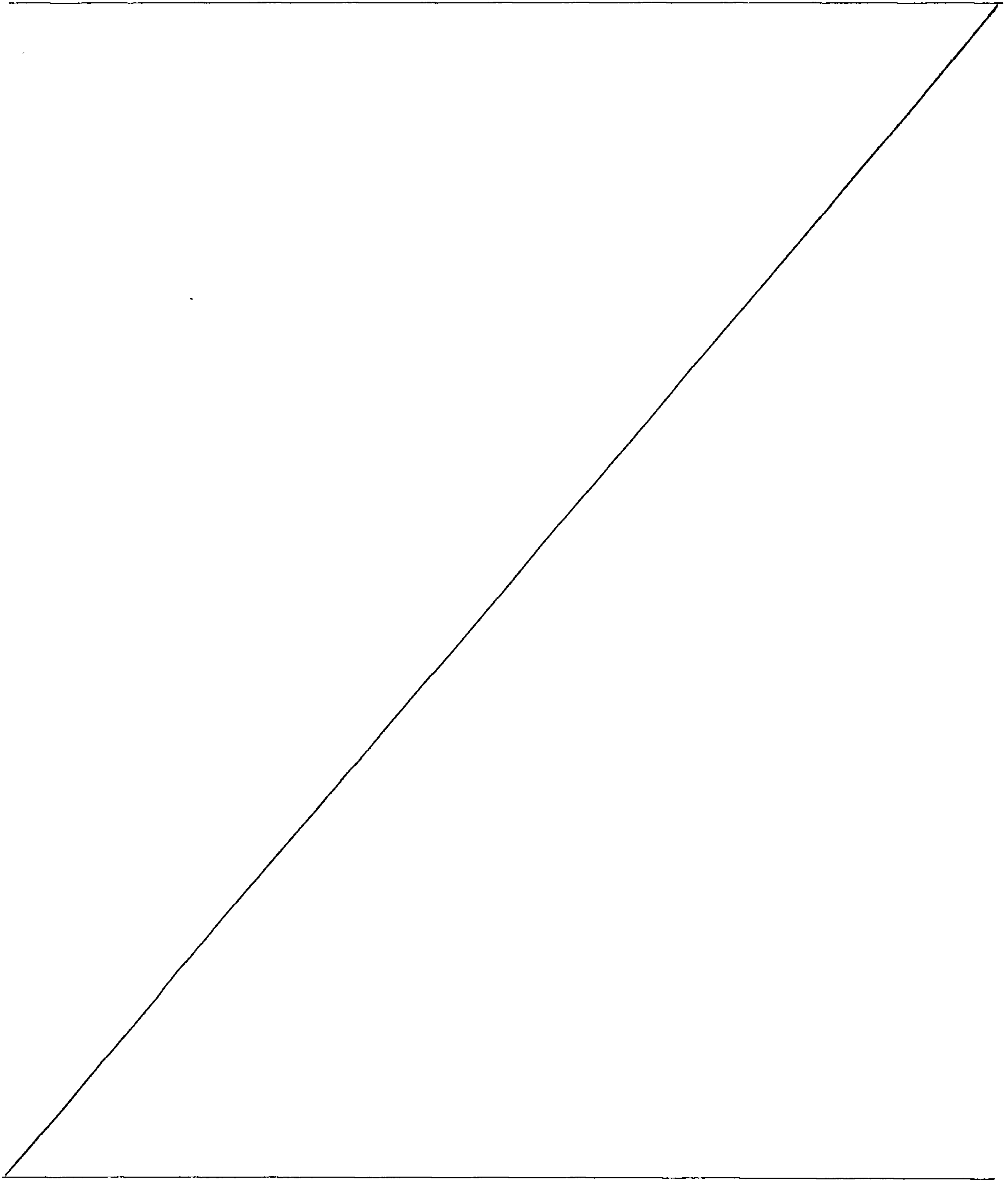
Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, il comprend en outre une étape c) de
30 détermination de l'affinité de liaison de chacun des peptides préparés à l'étape b) pour la molécule HLA de classe I concernée, et de la stabilité d'un complexe entre ledit peptide et ladite molécule HLA de classe I.

4a

Cette étape permet l'évaluation de l'immunogénicité potentielle des peptides.

En effet, des peptides non-immunogènes présentent le plus souvent une faible affinité pour la molécule HLA de

5



classe I, et/ou forment avec celle-ci un complexe peu stable. Des méthodes pour déterminer l'affinité du peptide pour la molécule HLA, et la stabilité du complexe formé sont connues en elles-mêmes. On citera par exemple celle décrite par FIRAT
5 et al. (Eur. J. Immunol., 29, 3112, 1999).

L'affinité d'un peptide pour une molécule HLA est le plus souvent définie par rapport à celle d'un peptide de référence (par exemple IVGAETFYV (SEQ ID No : 1) pour HLA-A*0201 ou RIPHERNGFTV (SEQ ID No : 2) pour HLA-B*0702), sous
10 forme d'affinité relative. L'affinité relative est définie comme le rapport entre la concentration du peptide testé et la concentration du peptide de référence permettant la formation dans les mêmes conditions, de la même quantité de complexe peptide/molécule HLA de classe I. Plus l'affinité
15 relative est importante, plus l'affinité de liaison du peptide pour la molécule HLA de classe I sera faible.

La stabilité du complexe peptide/molécule HLA de classe I. est souvent définie par la DC50, qui représente le temps nécessaire à la dissociation de 50% des complexes
20 formés.

Généralement, l'affinité relative est inférieure à 5 et la DC₅₀ supérieure à 2 heures dans le cas des peptides potentiellement immunogènes.

Si la mise en œuvre de l'étape c) fait apparaître
25 un ou plusieurs peptides potentiellement immunogène(s), l'immunogénicité de ceux-ci peut être vérifiée, par exemple par des méthodes classiques de détermination de la capacité de ce peptide à générer, *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro* une réponse CTL spécifique vis-à-vis de cellules-cibles chargées
30 avec ce peptide, ou exprimant l'antigène dont il est issu, ou d'autres antigènes de la même famille.

Si aucun peptide potentiellement immunogène n'est mis en évidence à l'étape c) le procédé conforme à l'invention comprend une étape supplémentaire de préparation
35 d'un peptide variant à partir des peptides obtenus à l'étape b) par substitution d'un ou plusieurs des acides aminés situés en dehors de la séquence pentapeptidique commune, par un ou des acides aminés favorables à l'immunogénicité, par

exemple, par un des résidus du motif d'ancrage défini pour la molécule HLA de classe I concernée. On peut également substituer l'acide aminé N-terminal par une tyrosine, comme décrit dans la Demande PCT WO 02/08716.

5 L'affinité de ce peptide variant pour la molécule concernée peut être déterminée comme indiqué ci-dessus. Son immunogénicité sera ensuite vérifiée en déterminant sa capacité à générer une réponse CTL spécifique vis-à-vis du peptide natif dont il est issu, ainsi que de l'antigène dont
10 provient ce peptide natif, et des autres antigènes de la même famille.

La mise en œuvre du procédé conforme à l'invention a ainsi permis aux Inventeurs d'identifier des épitopes partagés par les antigènes de la famille MAGE-A,
15 ainsi que des épitopes partagés par des antigènes de la famille HER.

Les Inventeurs ont en particulier obtenu, à partir d'une région commune aux antigènes MAGE-A1, -2, -3, -4, -6, -10 et -12 de la famille MAGE-A, un peptide
20 immunogène présenté par HLA-A*0201, et capable d'induire des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant tous les antigènes MAGE-A, et de lyser des cellules tumorales exprimant au moins un antigène de la famille MAGE-A.

Ce peptide, qui est défini par la séquence (code
25 1 lettre) : YLEYRQVPV (SEQ ID No : 3), fait également partie de l'objet de la présente invention.

De même, les Inventeurs ont obtenu, à partir d'une région commune aux antigènes HER1, 2, 3 et 4, un peptide immunogène présenté par HLA-A*0201, et capable
30 d'induire des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant tous les antigènes HER1, 2, 3 ou 4 et de lyser des cellules exprimant au moins un antigène de la famille HER.

Ce peptide, qui est défini par la séquence (code
35 1 lettre) : YVWELMTFGV (SEQ ID No : 4), fait également partie de l'objet de la présente invention.

Les épitopes peptidiques obtenus conformément à l'invention, et notamment les peptides YLEYRQVPV (SEQ ID No : 3) et YVWELMTFGV (SEQ ID No : 4), sont utilisables dans le

cadre de l'immunothérapie anti-tumorale, pour induire une réponse CTL à large spectre, permettant le traitement d'une grande variété de tumeurs. En outre, dans le cas de peptides, comme le peptide YLEYRQVPV (SEQ ID No : 3), dérivés de la famille MAGE-A dont l'expression, en dehors des testicules et du placenta qui sont des tissus immunoprivilégiés, se limite aux seuls tissus tumoraux, le risque de réaction auto-immune est considérablement réduit.

La présente invention a également pour objet des compositions comprenant au moins un peptide immunogène conforme à l'invention.

Il peut s'agir de compositions multiépitopiques, capables de générer une réponse CTL polyspécifique, et qui dans ce but comprennent également un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s). Ces épitopes peuvent être issus du même antigène, ou de deux ou plusieurs antigènes différents.

Ces compositions multiépitopiques conformes à l'invention peuvent également comprendre au moins un épitope présenté par une molécule du CMH II, et capable d'induire une réponse T auxiliaire. Elles peuvent comprendre en outre, pour être plus largement utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, un ou plusieurs épitopes présentés par des molécules du CMH I autres que HLA-A*0201.

Selon un mode de réalisation préféré d'une composition conforme à l'invention, elle comprend au moins un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide immunogène conforme à l'invention. Dans le cas d'une composition multiépitopique, ledit polypeptide chimérique comprend en outre une ou plusieurs copies d'au moins un autre épitope immunogène.

Un tel polypeptide chimérique peut être facilement obtenu par des méthodes connues en elles-mêmes, et notamment par les techniques classiques de l'ADN recombinant.

La présente invention a également pour objet les molécules d'acide nucléique codant pour un peptide immunogène ou pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention.

Ainsi la composition de la présente invention, comprend au moins un peptide immunogène obtenu par le procédé de l'invention et défini par l'une des séquences suivantes:

YLEYRQVPV (SEQ ID no. 3) ou YVWELMTFGV (SEQ ID no. 4); ou

5 un polynucléotide codant pour ledit peptide immunogène et un excipient.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un épitope peptidique immunogène, d'une composition, ou d'une molécule d'acide nucléique conforme à
10 l'invention pour l'obtention d'un médicament, et notamment d'un médicament destiné à l'immunothérapie antitumorale telle que l'immunothérapie de tumeurs exprimant au moins un gène de la famille MAGE-A, ou au moins un gène de la famille HER. Le médicament de l'invention peut également être destiné au
15 traitement de patients HLA-A*0201.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un épitope peptidique immunogène, d'une composition, ou d'une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et notamment
20 d'un médicament destiné à l'immunothérapie antitumorale.

La présente invention englobe également les médicaments comprenant, en tant que principe actif, au moins un peptide immunogène, une composition, ou une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention.

25 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, lesdits médicaments sont des vaccins.

Des médicaments conformes à l'invention peuvent comprendre en outre les excipients usuels, ainsi que des adjuvants habituellement utilisés en immunothérapie, et
30 permettant par exemple de favoriser l'administration du principe actif, de le stabiliser, d'augmenter son immunogénicité, etc.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à

8a

des exemples non-limitatifs de mise en œuvre du procédé conforme à l'invention pour identifier des épitopes partagés dans la famille MAGE-A et dans la famille HER.

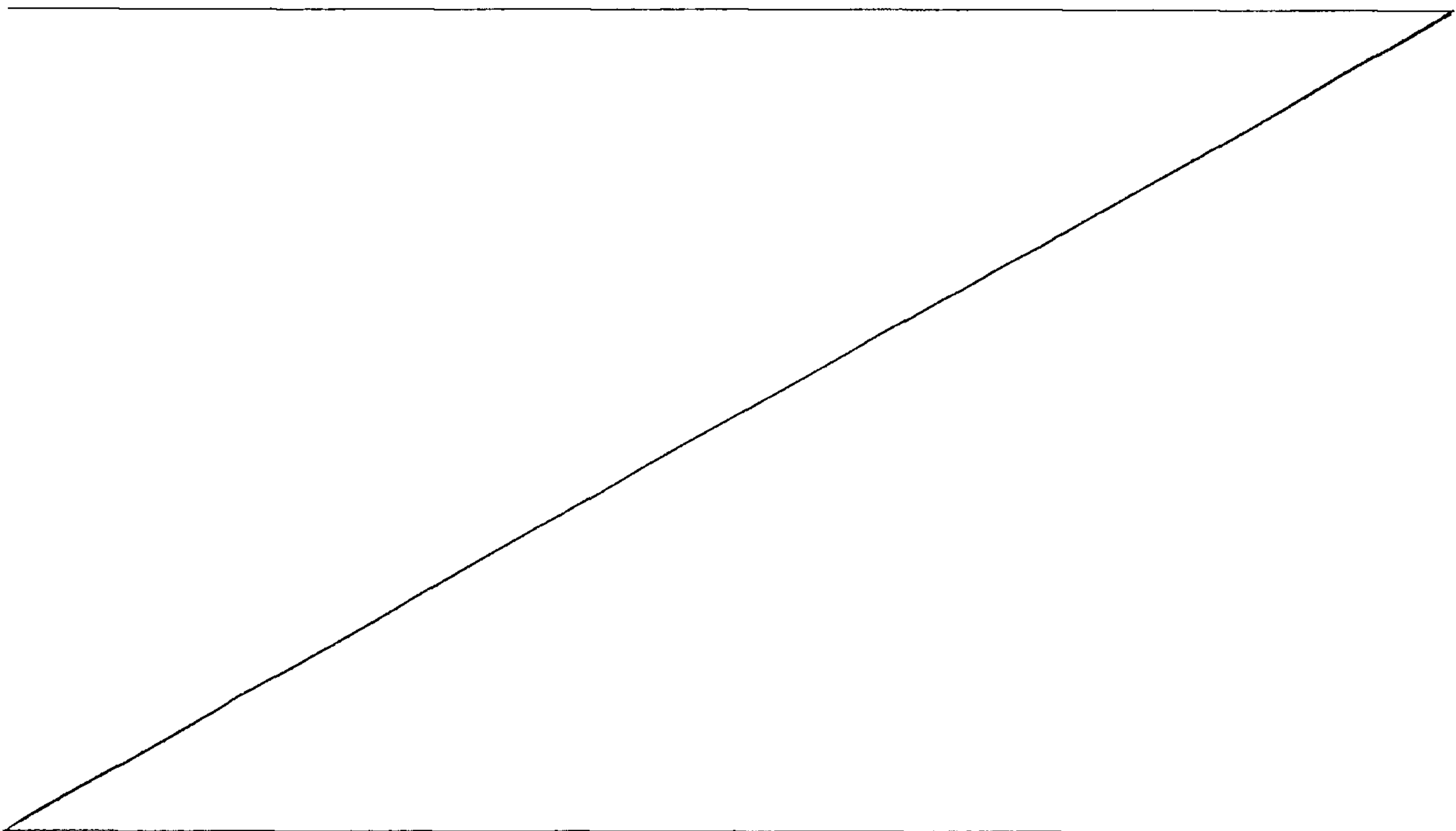
EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION D'ÉPITOPES PRÉSENTÉS PAR LA
5 MOLÉCULE HLA-A*0201 PARTAGÉS PAR LES ANTIGÈNES MAGE-A 1, 2, 3, 4, 6, 10 ET 12.

I : Identification de peptides candidats :

Pour identifier un ou plusieurs épitopes partagés par les différents antigènes MAGE-A et présentés par la
10 molécule HLA-A*0201, les séquences des antigènes MAGE-A ont été alignées, et des régions de 9 à 10 acides aminés ont été sélectionnées sur la base de leur homologie entre ces antigènes.

Dans le descriptif qui suit, ces régions de 9 à 10
15 acides aminés sont désignées par référence à la position de leur premier acide aminé dans la séquence MAGE-A1.

Un seul peptide, p262, a été retrouvé à l'identique dans toutes les séquences MAGE-A. Un autre



peptide, p174, a été retrouvé à l'identique dans les séquences MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12

Pour élargir le choix des peptides candidats, une seconde recherche a été effectuée pour sélectionner des régions présentant une complète identité de séquences entre les positions P4 et P8. Deux régions respectaient ce critère : 248 et 264. Les séquences des groupes de peptides issus de ces régions, ainsi que celle des peptides p174 et p262 sont représentées sur le Tableau I.

Tableau I

Peptides	Séquences	Antigène MAGE-A
174	CLGLSYDGLL (SEQ ID No : 5)	A1, A2, A3, A4, A6, A12
248	YLEYRQVPG (SEQ ID No : 6) YLEYRQVPD (SEQ ID No : 7)	A2, A3, A4, A6, A10, A12 A1
262	YEFLWGPRA (SEQ ID No : 8)	A1, A2, A3, A4, A6, A10, A12
264	FLWGPRALV (SEQ ID No : 9) FLWGPRALI (SEQ ID No : 10) FLWGPRALA (SEQ ID No : 11)	A3, A12 A2, A6 A1, A4

Le groupe p248 est composé de deux peptides : p248G9 (MAGE-A2, -A3, -A4, -A6, -A10, -A12) et p248D9 (MAGE-A1) différant par leur résidu C-terminal (position P9). Le groupe p264 a été exclu de la suite de l'étude, car il correspond à un épitope déjà connu de MAGE-A3 (FLWGPRALV (SEQ ID No : 9)) restreint à HLA-A*0201, et il est également connu qu'il n'est pas apprêté efficacement par les cellules tumorales (MICONNET *et al.*, J. Biol. Chem., 275, 26892, 2000).

II : Affinité pour HLA-A*0201 des peptides sélectionnés, et construction de variants potentiellement plus immunogènes.

L'affinité des peptides sélectionnés pour HLA-A*0201 a été définie par deux paramètres : l'affinité relative (RA) qui reflète la capacité des peptides à se fixer à HLA-A*0201, et la vitesse de dissociation des complexes HLA-A*0201/peptide (DC₅₀) qui témoigne de leur stabilité. Les peptides à affinité élevée (RA<5 et DC₅₀>2 hrs), sont potentiellement immunogènes, contrairement aux peptides à faible affinité (RA>5 et DC₅₀<2 hrs).

Affinité relative :

Des cellules T2 (FIRAT *et al.*, Eur. J. Immunol., 29, 3112, 1999) (3x10⁵ cellules/ml) humaines, qui sont déficientes en transporteurs TAP, sont incubées à 37°C

pendant 16 heures avec diverses concentrations (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) de chaque peptide à tester dans du milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté avec 100 ng/ml de β 2-microglobuline humaine. Ensuite, elles sont lavées deux
5 fois, et marquées avec l'anticorps monoclonal BB7.2 (PARHAM et al., Hum. Immunol., 3, 4, 277-299, 1981) qui est spécifique de la molécule HLA-A*0201, puis avec un anticorps de chèvre anti-Ig de souris, couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

10 Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux. Pour chaque concentration de peptide, la fluorescence spécifique de HLA-A*0201 est calculée en tant que pourcentage de la fluorescence obtenue avec 100 μ M d'un peptide de référence (HIVpol 589 ; IVGAETFYV (SEQ ID No :
15 1)). L'affinité relative (RA) est définie comme le rapport de la concentration de chaque peptide induisant 20% de la fluorescence obtenue avec 100 μ M du peptide de référence, à la concentration du peptide de référence induisant 20% de la fluorescence obtenue avec 100 μ M dudit peptide de référence.
20 Plus l'affinité relative est faible, et plus fortement le peptide se lie à HLA-A*0201. La RA moyenne pour chaque peptide est déterminée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Dans toutes les expériences, 20% de la fluorescence maximale ont été obtenus pour 1 à 3 μ M du
25 peptide de référence.

Stabilité :

Des cellules T2 (10^6 /ml) sont incubées pendant une nuit à 37°C avec 100 μ M de chaque peptide à tester dans du milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté avec 100 ng/ml de
30 β 2-microglobuline humaine. Ensuite, elles sont lavées à quatre reprises pour éliminer les peptides libres, incubées avec du BREFELDIN A (SIGMA ; 10 μ g/ml) pendant une heure pour prévenir l'expression à leur surface des molécules HLA-A*0201 nouvellement synthétisées, lavées et incubées à 37°C pendant
35 0, 2, 4, 6 ou 8 heures. Pour chaque temps d'incubation, les cellules sont ensuite marquées, comme indiqué ci-dessus, avec l'anticorps BB7.2, et analysées en cytométrie de flux pour

évaluer la quantité de complexe peptide/HLA-A*0201 présent à leur surface. Cette quantité est évaluée par la formule : (fluorescence moyenne des cellules T2 préincubées avec le peptide - fluorescence moyenne des cellules T2 traitées dans des conditions similaires en l'absence de peptide). Le DC₅₀ (complexe de dissociation : DC) est défini comme étant le temps requis pour la perte de 50% des complexes HLA-A*0201/peptide stabilisés à t=0.

Les résultats de ces expérimentations, présentés dans le Tableau II ci-après, montrent que les peptides p174, p262, p248G9 et p248D9 n'ont qu'une affinité faible pour HLA-A*0201.

Pour augmenter cette affinité, et par conséquent leur immunogénicité, les peptides p262, p248G9 et p248D9 ont été modifiés en remplaçant les résidus situés aux positions P2 ou C-terminale, par des résidus d'ancrage spécifiques de l'allèle HLA-A*0201, pour produire les variants p262L2 et p248V9. Pour le peptide p174, deux variants ont été produits : dans l'un (p174Y1), le résidu en position P1 a été remplacé par une tyrosine, dans le second (P174Y1V10), le résidu C-terminal P10 a en outre été remplacé par le résidu valine, susceptible de permettre un ancrage plus fort.

L'affinité de ces variants pour HLA-A*0201 a été déterminée comme décrit ci-dessus.

Les résultats, résumés dans le Tableau II, montrent que les variants p262L2 et p248V9 possèdent une affinité de liaison importante (RA = 0,2 et 1,8 respectivement) et forment des complexes stables (DC₅₀ = 6h et 4h respectivement). P174Y1V10 possède également une affinité de liaison importante (RA = 2,5) mais la stabilité du complexe formé apparaît insuffisante.

Tableau II

Peptides	Séquence	MAGE-A	RA	DC ₅₀
p174	CLGLSYDGLL (SEQ ID No : 5),	1, 2, 3, 4, 6, 12	41	<2
p174Y1	YLGLSYDGLL (SEQ ID No : 12)		13	<2
p174Y1V10	YLGLSYDGLV (SEQ ID No : 13)		2.5	<2
p248G9	YLEYRQVPG (SEQ ID No : 6)	2, 3, 4, 6, 10, 12	>27	<2
p248D9	YLEYRQVPD (SEQ ID No : 7)		22.5	<2
p248V9	YLEYRQVPV (SEQ ID No : 3)		1.8	4
p262	YEFLWGPRA (SEQ ID No : 8)	1, 2, 3, 4, 6, 10, 12	>35	<2
p262L2	YLFLWGPRA (SEQ ID No : 14)		0.2	6

EXEMPLE 2 : IMMUNOGENICITE DES PEPTIDES MAGE-A VARIANTS :**Induction de CTL spécifiques par vaccination avec les peptides variants**

5 L'immunogénicité des peptides variants p174Y1V10, p262L2, et p248V9 a été évaluée par génération de CTL sur des souris transgéniques HHD (PASCOLO *et al.*, J. Exp. Med., 185, 2043, 1997). Ces souris sont $\beta 2m^{-/-}$, $D^b^{-/-}$ et expriment une monochaîne HLA-A*0201 composée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de HLA-A*0201 et des domaines $\alpha 3$ et intracellulaire de D^b , reliée par son N-terminal au C-terminal de la $\beta 2$ -microglobuline humaine par un peptide de 15 acides aminés.

10 Les souris HHD reçoivent une injection sous-cutanée à la base de la queue avec 100 μ g de chaque peptide variant à tester émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund, en présence de 140 μ g d'un épitope auxiliaire T dérivé de l'antigène « core » de HBV (128-140, séquence TPPAYRPPNAPIL).

20 Après 11 jours, des cellules spléniques prélevées sur les souris (5×10^7 cellules dans 10 ml) sont stimulées *in vitro* avec le peptide à tester (10 μ M). Au 6ème jour de culture, les populations qui répondent sont testées pour déterminer une cytotoxicité spécifique. Les cellules qui répondent sont restimulées *in vitro* à des intervalles d'une semaine avec 2×10^7 cellules spléniques HHD irradiées (3000 rads) et 1 à 0,1 μ M de peptide en présence de 50 UI/ml d'IL2 recombinante (PROLEUKIN, CHIRON CORP).

25 Des essais de cytotoxicité sont effectués 6 jours après la dernière stimulation.

Des cellules RMA5-HHD sont utilisées comme cibles pour étudier la cytotoxicité. Ces cellules sont obtenues par transfection de cellules RMA5 murines avec la construction HHD comme décrit par PASCOLO *et al.* (J. Exp. Med., 185, 2043, 5 1997).

Ces cellules-cibles sont marquées avec 100 µCi de ⁵¹Cr pendant 90 minutes, puis lavées trois fois et étalées dans des plaques de 96 puits à fond rond (3×10³ cellules/puits dans 100 µl de RPMI 1640 + 3% de sérum de veau 10 fœtal). Elles sont chargées avec différentes concentrations de peptide à tester (variant, peptide natif, ou peptide témoin non-pertinent), à 37°C pendant 90 minutes.

Ensuite, 100 µl des cellules effectrices (rapport cellules effectrices/cellules cible = 40/1) sont ajoutés dans 15 les puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Après incubation, 100 µl de surnageant sont collectés et la radioactivité est mesurée dans un compteur γ.

Le pourcentage de lyse spécifique est calculé par la formule : [(libération de ⁵¹Cr expérimentale-libération de 20 ⁵¹Cr spontanée)/(libération de ⁵¹Cr maximale-libération de ⁵¹Cr spontanée)] × 100. Dans toutes les expériences, la libération spontanée est inférieure à 20% de la libération maximale induite par HCl 3N.

Les résultats de ces expérimentations sont 25 illustrés par la Figure 1A.

Le peptide p174Y1V10 n'est pas capable de générer une réponse CTL, ce qui était prévisible au vu de la faible stabilité de son complexe avec HLA-A*0201.

Le peptide p262L2 induit des CTL capables de 30 reconnaître ce peptide, mais pas le peptide natif p262.

En revanche, le peptide p248V9 induit une réponse CTL dirigée non seulement contre ce variant, mais également contre les deux peptides natifs p248G9 et p248D9.

Ces résultats montrent que le variant p248V9 35 génère des CTL qui tuent les cibles RMA5-HHD chargées avec le peptide variant, ou avec le peptide natif correspondant.

Dans le cas du peptide p262L2, la non-conservation de l'antigénicité du peptide natif peut

s'expliquer par la modification de structure très importante résultant de la substitution en position P2 d'un résidu glutamate par un résidu leucine, de taille et de charge très différentes.

5 **Reconnaissance des épitopes apprêtés naturellement d'antigènes MAGE-A par des CTL induites par le peptide p248V9**

Une lignée de CTL dénommée CTL248, a été établie à partir des cellules spléniques d'une souris HDD immunisée avec le peptide p248V9, par stimulation répétées *in vitro*
10 avec des concentrations décroissantes de p248G9 (10 μ M-1 μ M). Cette lignée est maintenue en culture en présence de 1 μ M du peptide p248G9.

Pour tester si les cellules de la lignée CTL248 pouvaient reconnaître des antigènes MAGE-A apprêtés
15 naturellement, deux types d'expérimentations ont été effectués.

1) Stimulation par des cellules COS-7 transfectées exprimant des antigènes MAGE-A.

Les cellules de la lignée CTL248 sont stimulées,
20 pour chacun des antigènes MAGE-A1,-A2,A3,-A4,-A6,-A10 et -A12, avec des cellules COS-7 de singe co-transfectées avec la construction HHD (PASCOLO *et al.* précité) et un plasmide contenant l'ADNc dudit antigène. A titre de témoins négatifs on utilise des cellules COS-7 transfectées soit avec la
25 construction HHD seule, soit avec l'ADNc de l'antigène MAGE-A concerné. La stimulation des CTL est évaluée par mesure de leur sécrétion de TNF- α . A titre de témoin positif, on utilise les cellules COS-7 transfectées avec la construction HHD et chargées avec les peptides p248D9 et p248G9.

30 4 jours après la transfection, les cellules COS-7 sont mises en contact avec les cellules CTL248 à raison de 5×10^4 CTL pour 3×10^4 cellules COS-7 dans du RPMI 1640 en présence de 10% SVF.

Après 6 heures d'incubation, le surnageant est
35 prélevé et mis en contact avec des cellules de fibrosarcome de souris WEHI164 clone 13 (3×10^4 par puits) qui se caractérisent par une forte sensibilité à l'apoptose induite

par le TNF- α . Afin de quantifier la teneur en TNF des surnageants de culture, une gamme étalon de TNF- α (concentrations de 0 à 10⁴ pg/mL) est utilisée en parallèle. Après 16 heures d'incubation à 37°C, la viabilité des
 5 cellules WEHI-164 clone 13 est déterminée par un test colorimétrique au MTT (SIGMA) (ESPEVIK et NISSEN MEYER, J. Immunol. Methods., 95, 99, 1986).

Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

Ces résultats montrent que la lignée CTL248
 10 répond à la stimulation par les cellules COS co-exprimant HHD et un antigène MAGE-A. Tous les antigènes MAGE-A1,-A2,A3,-A4,-A6,-A10 et -A12, sont reconnus par cette lignée.

En revanche, on n'observe aucune réponse aux cellules COS transfectées séparément par la construction HHD
 15 ou par l'ADNc d'un antigène MAGE-A.

2) Stimulation par des cellules tumorales humaines HLA-A*0201 exprimant des antigènes MAGE-A.

Les lignées tumorales HLA-A*0201 suivantes ont été utilisées :

- 20 - lignées exprimant au moins un antigène MAGE-A : M44 et M113 (mélanome) ; OBR (cancer de la vessie) ;
 - lignées n'exprimant pas d'antigènes MAGE-A : MCF-7 (cancer du sein) et Caco-2 (cancer colon).

Le profil d'expression HLA-A*0201 et MAGE-A de
 25 ces lignées est résumé dans le Tableau III ci-dessous.

Tableau III

Lignée cellulaire	HLA-A*0201	MAGE-A1	MAGE-A2	MAGE-A3	MAGE-A4	MAGE-A6	MAGE-A10	MAGE-A12
M44	+	+	+	+	+	-	-	-
M113	+	-	+	+	-	-	-	-
OBR	+	-	-	-	-	+	+	-
Caco-2	+	-	-	-	-	-	-	-
MCF-7	+	-	-	-	-	-	-	-

La lignée CTL248 a été stimulée avec chacune des lignées tumorales mentionnées ci-dessus.

La stimulation est évaluée par détection de la
 30 sécrétion de TNF- α , comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3A, qui montre que les cellules CTL248 répondent à la stimulation

par les cellules MAGE-A+, quel que soit l'antigène MAGE-A exprimé, mais ne répondent pas aux cellules MCF-7 et Caco-2 qui n'expriment pas d'antigène MAGE-A.

Pour confirmer que la reconnaissance des cellules tumorales est bien restreinte par HLA-A*0201, les cellules CTL248 ont été stimulées par les cellules M44 préincubées pendant une heure avec un anticorps monoclonal anti-HLA-A*0201 (BB7.2) ou avec un anticorps non-pertinent (anti-CD 19), et la production de TNF α a été mesurée comme décrit ci-dessus.

Les résultats illustrés par la Figure 3B, montrent que seul l'anticorps BB7.2, qui bloque HLA-A*0201 inhibe la réponse des cellules CTL248.

Les résultats des expérimentations 1 et 2 ci-dessus montre que les CTL induites par p248V9 reconnaissent un épitope apprêté naturellement, commun aux antigènes MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A 10, et -A 12.

Induction de CTL humains spécifiques par le peptide p248V9.

La capacité de p248V9 à induire des CTL *in vitro* à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PMBC) de donneurs sains a été testée comme suit.

Les PBMC sont obtenues, à partir de prélèvements sanguins par leucocytophérèse sur des donneurs sains, après centrifugation à 2000 rpm pendant 20 min sur gradient de Ficoll/Hypaque (AMERSHAM). Après 3 lavages en NaCl 0.9%, elles sont resuspendues dans du milieu complet (RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum humain AB inactivé par la chaleur, 40 μ g/mL de gentamicine (PANPHARMA) et 2 μ M de L-glutamine (GIBCO)), et incubées à 37°C pendant 2 heures. Après incubation, les cellules non-adhérentes sont prélevées. Les cellules adhérentes sont différenciées en cellules dendritiques par mise en culture dans une poche en TEFLON à raison de 3×10^6 cellules/mL dans du milieu complet supplémenté avec 500 UI/mL de GM-CSF (R & D SYSTEMS) et 500 UI/mL d'IL-4 (R & D SYSTEMS). Au septième jour, des agents de maturation (100 ng/ml de polyI:C et 2 μ g/ml d'anticorps anti-CD40) sont ajoutés à la culture. Après 24 heures, les cellules

dendritiques matures sont chargées avec le peptide p248V9 par incubation pendant 2 heures avec 10 μ M de peptide en présence de 5 μ g/ml de β 2-microglobuline, puis irradiées à 3500 rads ; elles sont ensuite lavées pour éliminer le peptide libre. Des cellules CD8+ sont isolées à partir des cellules non-adhérentes à l'aide de microbilles couplées à un anticorps anti-CD8 (MILTENYI BIOTEC).

2 $\times$ 10⁵ cellules CD8+ sont stimulées avec 2 $\times$ 10⁴ cellules dendritiques chargées avec le peptide, dans du milieu complet supplémenté avec 1000 UI/ml d'IL-6 et 5 UI/ml d'IL-12 dans un volume final de 100 μ l/puits dans une plaque à 96 puits. A partir du septième jour les cultures sont restimulées *in vitro* chaque semaine, avec les cellules dendritiques chargées par le peptide en présence de 20 UI/ml d'IL-2 et 10 ng/ml d'IL-7. Après la troisième restimulation, les cellules CD8+ sont collectées et stimulées avec des cellules B allogéniques HLA-A*0201 transformées par EBV, dans un rapport 1/2, en présence de 10 μ M de peptide pendant 16 heures.

Les cellules CD8+ productrices d'IFN- γ sont purifiées en utilisant un kit du commerce (IFN- γ secretion assay-cell enrichment and detection kit, MILTENYI BIOTECH). Les cellules ainsi purifiées sont cultivées pendant une semaine dans du milieu complet supplémenté avec 20 UI/ml d'IL-2 et 10 ng/ml IL-7.

La réponse de ces cellules CD8+ à des cellules T2 chargées avec l'un des peptides p248V9, p248G9 ou p248D9, ou avec un peptide non-pertinent (HIVgag76), ou à des cellules tumorales HLA-A*0201+MAGE-A+ (M44 et M113) ou HLA-A*0201+MAGE-A⁻ (Caco-2) est évalué par dosage de la production d'IFN γ intra-cellulaire.

Les cellules CD8+ sont incubées avec les cellules de la lignée tumorale testée, en présence de 20 μ g/ml de BREFELDINE-A (SIGMA). Après 6 heures, elles sont lavées, marquées avec un anticorps anti-CD8 conjugué à la r-phycoérythrine (CALTAG LABORATORIES) dans du PBS pendant 25 min à 4°C, lavées et fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. Elles sont ensuite perméabilisées par de la saponine (SIGMA)

à 0,2% dans du PBS, et marquées avec un anticorps monoclonal anti-IFN γ conjugué à l'allophycocyanine (PHARMINGEN).

Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux (FACSCaliburTM (BECTON DICKINSON) et logiciel
5 CellQuestTM).

Les résultats sont illustrés par la Figure 4 : (% de cellules productrices d'IFN γ en fonction du peptide ou de la lignée tumorale testée)

La Figure 4A montre une réponse des cellules CD8+ vis-à-vis des cellules T2 chargées avec p248V9, p248G9 ou p248D9, mais pas vis-à-vis des cellules T2 chargées avec le peptide non-pertinent.

La Figure 4B montre une réponse des cellules CD8+ vis-à-vis des lignées tumorales MAGE-A+ M44 et M113 mais pas
15 vis-à-vis de la lignée MAGE-A⁻ Caco-2. La Figure 4C montre en outre que la réponse vis-à-vis de la lignée M44 est fortement inhibée par l'anticorps anti-HLA-A*0201 BB7.2, mais pas par l'anticorps non-pertinent anti-CD 19 Ab.

Ces résultats démontrent que le peptide p248V9
20 induit des CTL humains capables de reconnaître également les peptides natifs correspondants, et capables de reconnaître des cellules tumorales exprimant des antigènes MAGE-A variés.

EXEMPLE 3 : IDENTIFICATION D'EPITOPES PRESENTES PAR LA MOLECULE HLA-B*0702 PARTAGES PAR LES ANTIGENES MAGE-A1, -A2, -A3, A4, A6, A10 ET -A12.
25

L'alignement des séquences des MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 et -A12 révèle un groupe de 9-mers identiques dans les séquences MAGE-A1, -A2, -A3 et -A6. Le peptide issu de MAGE-A4 qui a une leucine en P2 peut être modifié dans cette
30 position par une substitution L $\rightarrow$ P. Le peptide issu de MAGE-A12 possède une phénylalanine en P3, mais partage avec les peptides issus de MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, et -A6 la séquence TKAEML (positions P4-P9). Seul le peptide issu de MAGE-A10 ne contient pas de séquence d'au moins 5 acides aminés commune
35 avec les peptides issus des autres antigènes MAGE-A.

Les différents groupes de peptides natifs et le peptide variant sont représentés dans le Tableau IV ci-

dessous. Les résidus au niveau desquels les peptides natifs diffèrent sont indiqués en caractères gras.

Tableau IV

Antigène	Peptides natifs	Peptide variant
MAGE-A1	EPVTKAEML (SEQ ID No : 37)	EPVTKAEML (SEQ ID No : 37)
MAGE-A2	EPVTKAEML (SEQ ID No : 37)	
MAGE-A3	EPVTKAEML (SEQ ID No : 37)	
MAGE-A4	ELVTKAEML (SEQ ID No : 39)	
MAGE-A6	EPVTKAEML (SEQ ID No : 37)	
MAGE-A10	EPITKAEIL (SEQ ID No : 40)	
MAGE-A12	EPFTKAEML (SEQ ID No : 41)	

EXEMPLE 4 : IDENTIFICATION D'EPITOPES PRESENTES PAR LA MOLECULE HLA-A*0201 PARTAGES PAR LES ANTIGENES HER1, HER2, HER3 ET HER4.

I : Identification de peptides candidats et construction de variants potentiellement plus immunogènes :

L'alignement des séquences des quatre protéines HER a été effectué comme décrit dans l'exemple 1 et révèle 6 groupes de 9-mers et/ou de 10-mers qui présentent une homologie complète dans la région P3-P8/9. Pour chaque groupe a été défini un variant qui devait avoir une forte affinité pour HLA-A*0201 et être capable de stimuler une réponse cytotoxique spécifique des peptides natifs. Les modifications portent sur les positions d'ancrage P2 et P9/10 (substitution de l'acide aminé d'origine autre que L/V/M/I par une L en P2 et par une V en P9/10) et sur la position P1 (substitution de l'acide aminé par une Y).

Les différents groupes de peptides natifs et les peptides variants sont représentés dans le Tableau V ci-dessous. Les résidus au niveau desquels les peptides natifs diffèrent sont indiqués en caractères gras.

Tableau V

Antigène	Position du groupe de peptides	Peptides natifs	Peptides variants
HER2	722	KVKVLGSGA (SEQ ID No : 15)	YVKVLGSGV (SEQ ID No : 19)
HER3		KLKVLGSGV (SEQ ID No : 16)	
HER4		RVKVLGSGA (SEQ ID No : 17)	
HER1		KIKVLGSGA (SEQ ID No : 18)	
HER2	845	DLAARNVLV (SEQ ID No : 20)	YLAARNVLV (SEQ ID No : 22)
HER3		NLAARNVLL (SEQ ID No : 21)	
HER4		DLAARNVLV (SEQ ID No : 20)	
HER1		DLAARNVLV (SEQ ID No : 20)	
HER2	904	DVWSYGVTV (SEQ ID No : 23)	YVWSYGVTV (SEQ ID No : 25)
HER3		DVWSYGVTV (SEQ ID No : 23)	
HER4		DVWSYGVTI (SEQ ID No : 24)	
HER1		DVWSYGVTV (SEQ ID No : 23)	
HER2	911	TVWELMTFGA (SEQ ID No : 26)	YVWELMTFGV (SEQ ID No : 4)
HER3		TVWELMTFGA (SEQ ID No : 26)	
HER4		TIWELMTFGG (SEQ ID No : 27)	
HER1		TVWELMTFGS (SEQ ID No : 28)	
HER2	933	DLLEKGERL (SEQ ID No : 29)	YLLEKGERL (SEQ ID No : 31)
HER3		DLLEKGERL (SEQ ID No : 29)	
HER4		DLLEKGERL (SEQ ID No : 29)	
HER1		SILEKGERL (SEQ ID No : 30)	
HER2	945	PICTIDVYMI (SEQ ID No : 32)	YICTIDVYMV (SEQ ID No : 36)
HER3		QICTIDVYMV (SEQ ID No : 33)	
HER4		PICTIDVYMV (SEQ ID No : 34)	
HER1		PICTIDVYKI (SEQ ID No : 35)	

II : Affinité pour HLA-A*0201 des peptides sélectionnés :

L'affinité relative (RA) des peptides variants sélectionnés pour HLA-A*0201 a été mesurée comme décrit dans l'exemple 1.

Les résultats sont résumés dans le tableau VI et montrent que seul le variant p911Y1V9 présente une affinité de liaison importante (RA= 2,03), compatible avec un caractère immunogénique.

Tableau VI

Peptide	Séquence	RA
p722Y1V9	YVKVLGSGV (SEQ ID No : 19)	>100
p845Y	YLAARNVLV (SEQ ID No : 22)	>100
p904Y	YVWSYGVTV (SEQ ID No : 25)	>100
p911Y1V9	YVWELMTFGV (SEQ ID No : 4)	2,03
p933Y	YLLEKGERL (SEQ ID No : 31)	>100
p945Y1V9	YICTIDVYMV (SEQ ID No : 36)	>100

EXEMPLE 4 : IMMUNOGENICITE DES PEPTIDES HER VARIANTS :**I : Induction de CTL spécifiques par vaccination avec les peptides variants**

5 Deux lignées de CTL dénommées 1R5 et 2R5 ont été établies à partir des cellules spléniques de souris HHD immunisées avec le peptide variant p911Y1V9, selon le même protocole que celui décrit dans l'exemple 1.

Tests de cytotoxicité :

10 Des essais de cytotoxicité ont été effectués, comme décrit dans l'exemple 2. Pour cela, des cellules cibles RMAS-HHD, chargées avec 10µM des peptides à tester (variant ou peptides natifs), ont été incubées en présence de cellules des deux lignées CTL 1R5 et 2R5.

15 Les pourcentages de lyse spécifique observés en présence des lignées 1R5 (□) et 2R5 (■) et pour les différents peptides testés sont illustrés dans la figure 5.

Les cellules chargées avec le peptide p911Y1V9, ainsi que les peptides natifs HER1 911, HER2,3 911 ou HER4 20 911, induisent une réponse CTL.

Ces résultats montrent donc que le variant p911Y1V9 génère des CTL qui tuent les cellules cibles RMAS-HHD chargées avec le peptide variant p911Y1V9, mais également avec les peptides natifs HER1 911, HER2,3 911 ou HER4 911.

25 Production d'IFNγ intra-cellulaire :

La réponse des cellules de la lignée CTL 1R5 vis-à-vis des cellules RMAS-HHD chargées avec les différents peptides a également été évaluée par le dosage de leur production d'IFNγ intra-cellulaire.

30 Pour cela, les cellules de la lignée CTL 1R5 sont incubées en présence de cellules RMAS-HHD chargées avec le peptide variant p911Y1V9, les peptides natifs HER1 911,

HER2,3 911 ou HER4 911 ou un peptide non pertinent et en présence de 20 µg/ml de BREFELDINE-A (SIGMA). Après 6 heures, les cellules sont lavées, marquées avec un anticorps anti-CD8 conjugué à la r-phycoérythrine et incubées dans du PBS pendant 25 min à 4°C. Elles sont alors de nouveau lavées avant d'être fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4%. Les cellules sont ensuite perméabilisées par la saponine (SIGMA) à 0,2% dans du PBS, et marquées avec un anticorps monoclonal anti-IFN γ conjugué à l'allophococyanine (PHARMINGEN).

Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux (FACSCaliburTM (BECTON DICKINSON) et logiciel CellQuestTM).

Les résultats sont illustrés dans la figure 6 : (% de cellules productrices d'IFN γ en présence des cellules RMA-S-HHD chargées avec les différents peptides à tester).

La figure 6 montre, comme décrit dans la figure 5, une réponse des cellules CD8+ de la lignée CTL1R5 vis-à-vis des cellules RMA-S-HHD chargées avec le peptide variant p911Y1V9, avec les peptides natifs HER1 911, HER2,3 911 ou HER4 911, mais pas vis-à-vis des cellules RMA-S-HHD chargées avec le peptide non pertinent.

Ces résultats confirment que le peptide p911Y1V9 induit des CTL capables de reconnaître ce peptide variant, mais également les peptides natifs dont il est dérivé.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR)

<120> EPITOPES PEPTIDIQUES COMMUNS A DES ANTIGENES
D'UNE MEME FAMILLE MULTIGENIQUE

<130> 000468-0219

<140> INCONNU
<141> 2003/03/27

<150> PCT/FR2003/000970
<151> 2003/07/27

<150> FR 02 03 888
<151> 2002/03/28

<160> 41

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Val Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val
1 5 10

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 3

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 4

Tyr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Val
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide synthétique

<400> 5

Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ile
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 12

Tyr Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 13

Tyr Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Val

1 5 10

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> peptide modifié

<400> 14

Tyr Leu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
 1 5

<210> 19
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> peptide modifié

<400> 19

Tyr Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Val
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> peptide modifié

<400> 22

Tyr Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Ile
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> peptide modifié

<400> 25

Tyr Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Thr Ile Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Gly
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 31

Tyr Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val
1 5 10

<210> 35

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Lys Ile
 1 5 10

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> peptide modifié

<400> 36

Tyr Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu
 1 5

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu
 1 5 10

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Glu Leu Val Thr Lys Ala Glu Met Leu
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Pro Ile Thr Lys Ala Glu Ile Leu
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Pro Phe Thr Lys Ala Glu Met Leu
1 5

REVENDICATIONS

1. Peptide immunogène caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence YLEYRQVPV (SEQ ID No : 3).
2. Peptide immunogène caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence YVWELMTFGV (SEQ ID No : 4).
3. Polynucléotide codant pour un peptide selon la revendication 1 ou 2.
4. Composition comprenant au moins un peptide selon la revendication 1 ou 2, ou un polynucléotide selon la
10 revendication 3, et un excipient.
5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition multiépitopique comprenant en outre un ou plusieurs autre(s) peptide(s) immunogène(s) ou un ou plusieurs polynucléotide(s) codant pour le(s)dits peptide(s).
6. Composition selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'elle comprend un polypeptide chimérique comprenant: (i) au moins une copie d'un peptide selon la revendication 1 ou 2, et (ii) au moins une copie d'un autre peptide immunogène.
- 20 7. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend un polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique qui comprend : (i) au moins une copie d'un peptide selon la revendication 1 ou 2, et (ii) au moins une copie d'un autre peptide immunogène.

8. Médicament comprenant un peptide selon la revendication 1 ou 2, un polynucléotide selon la revendication 3, ou une composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 7.

9. Médicament selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'il est destiné à l'immunothérapie anti-tumorale.

10. Médicament selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il est destiné à l'immunothérapie de tumeurs exprimant au moins un gène de la famille MAGE-A.

11. Médicament selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il est destiné à l'immunothérapie de tumeurs exprimant au moins un gène de la famille HER.

12. Médicament selon une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisée en ce qu'il est destiné au traitement de patients HLA-A*0201.

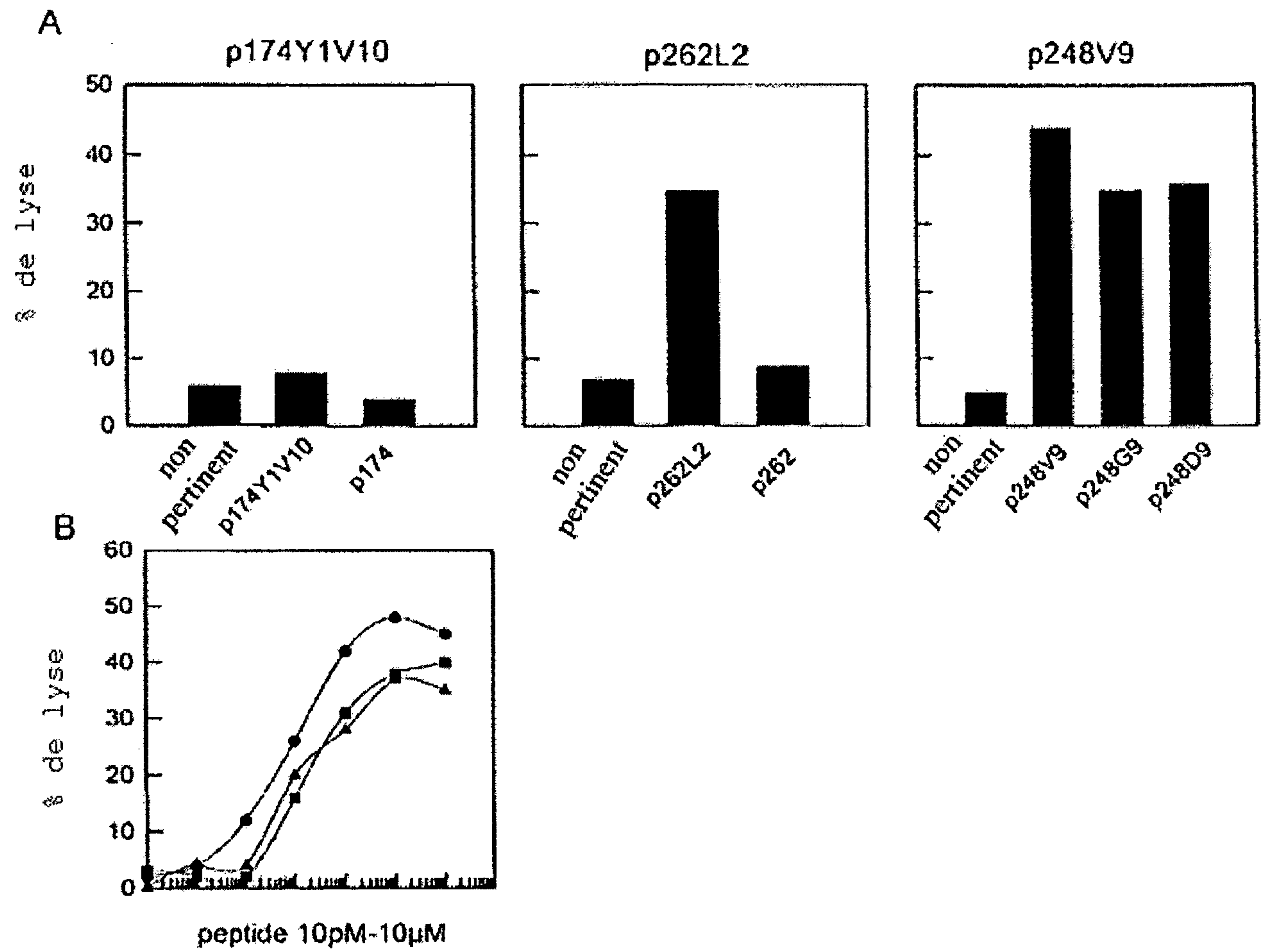


FIG 1

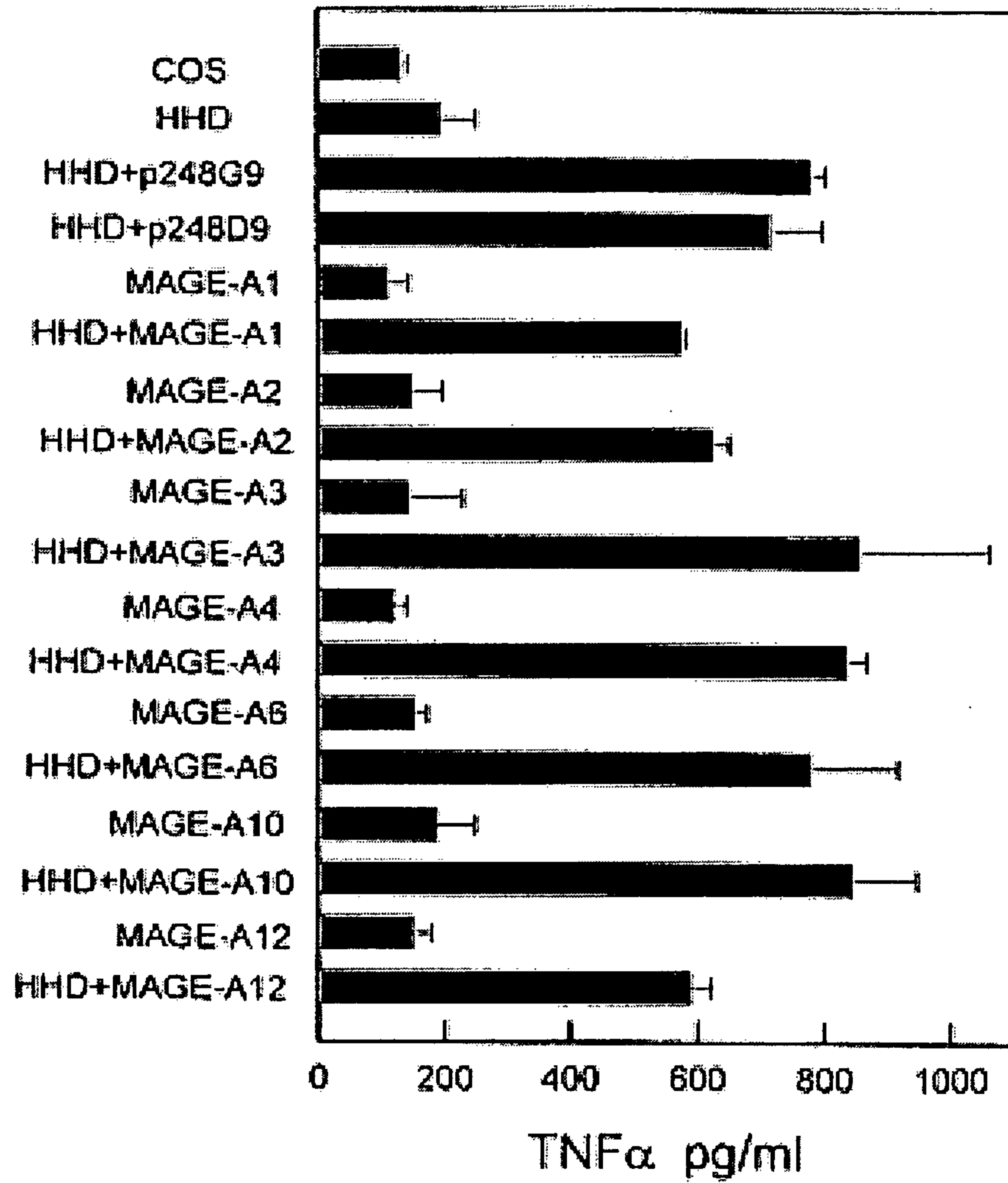


FIG 2

3/6

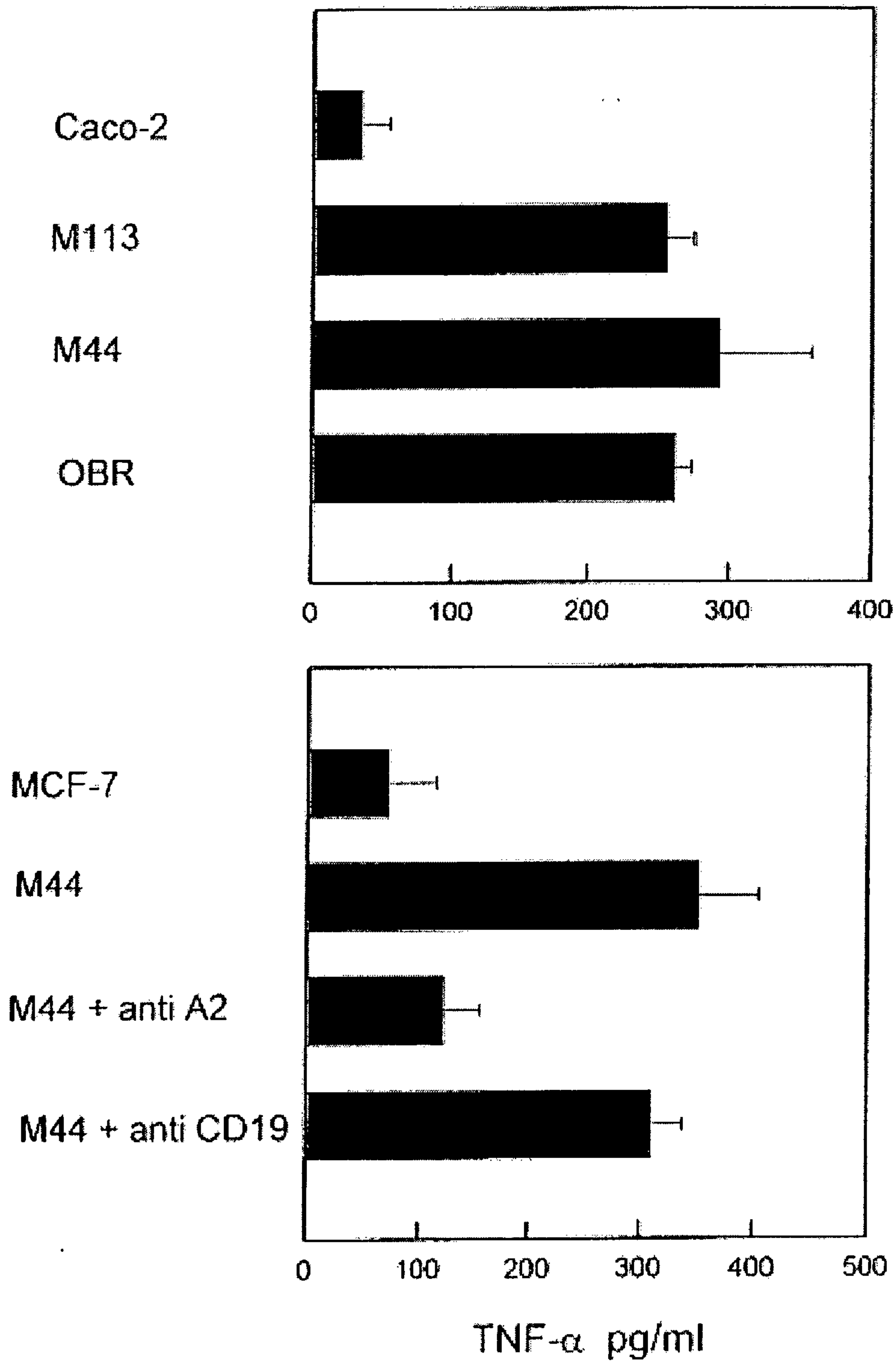
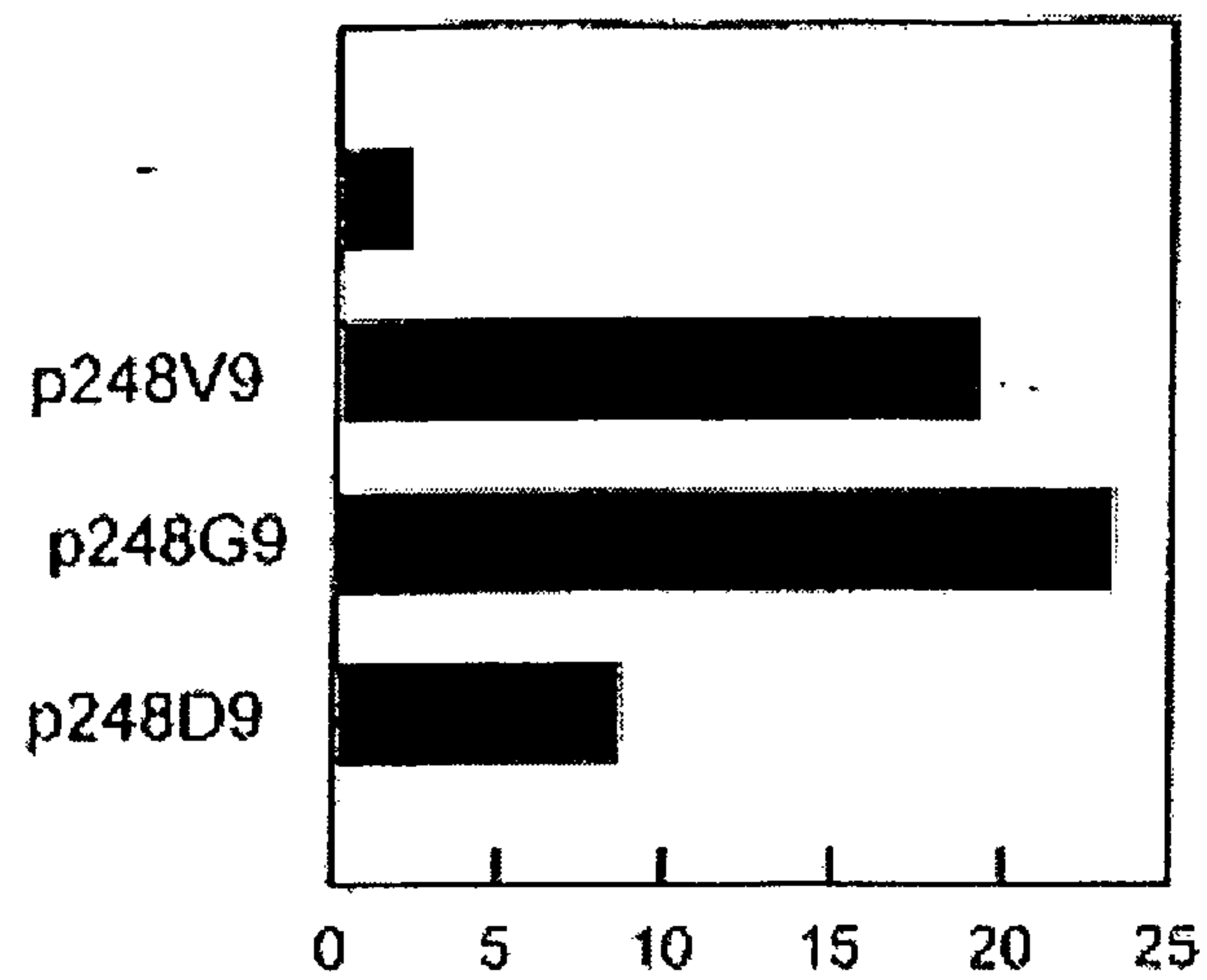


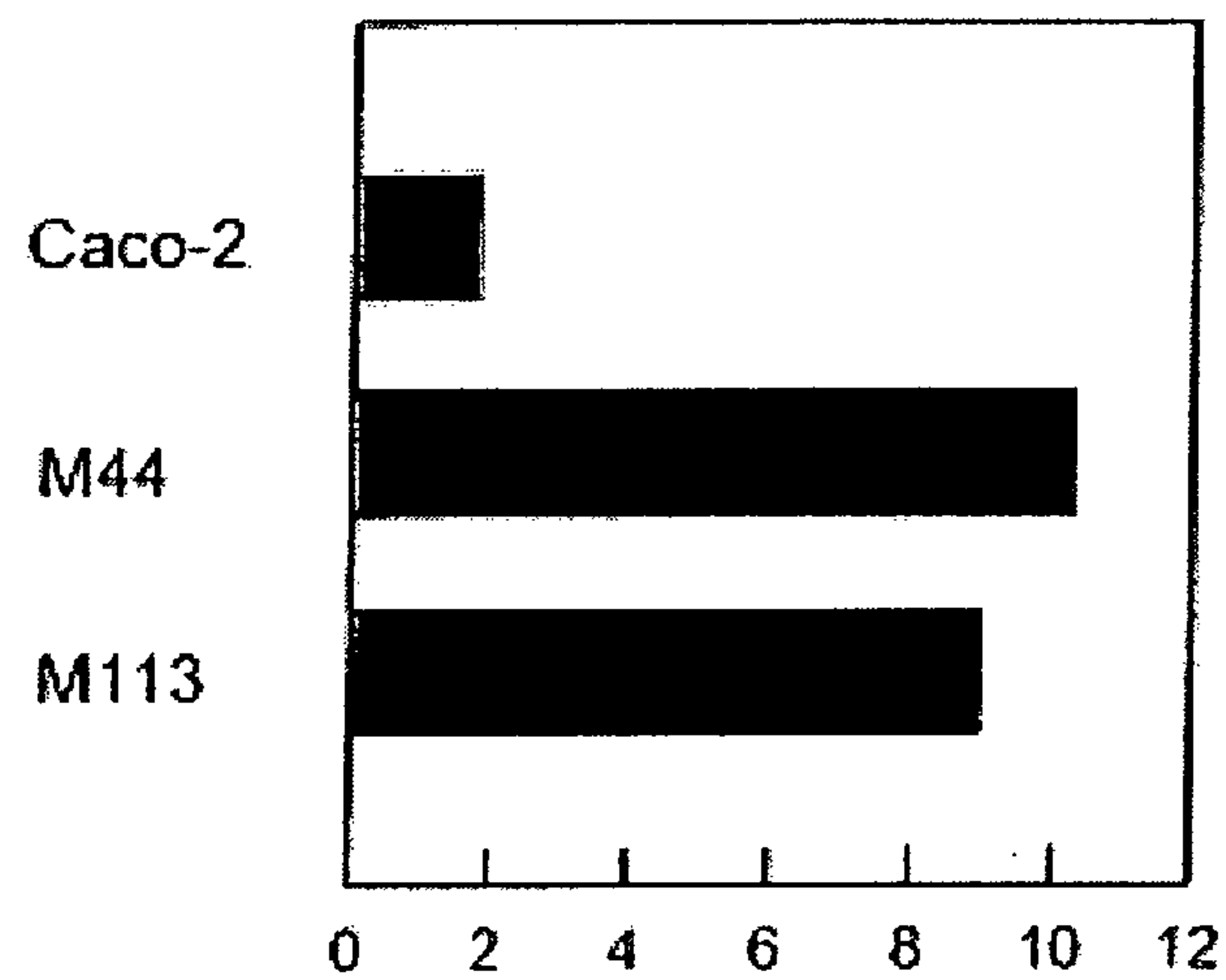
FIG 3

4/6

A



B



C

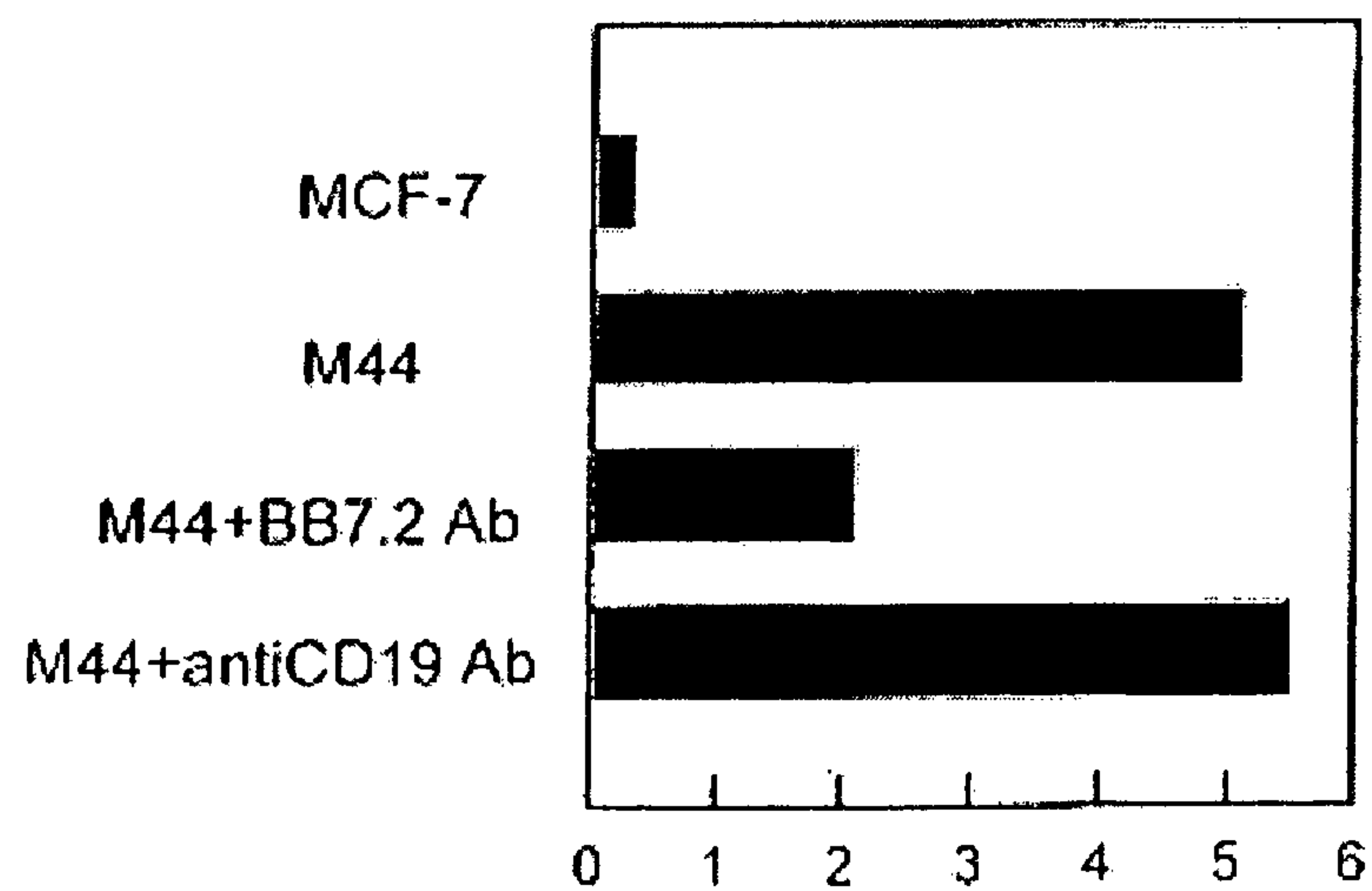
% de cellules CD8 produisant de l'IFN γ

FIG 4

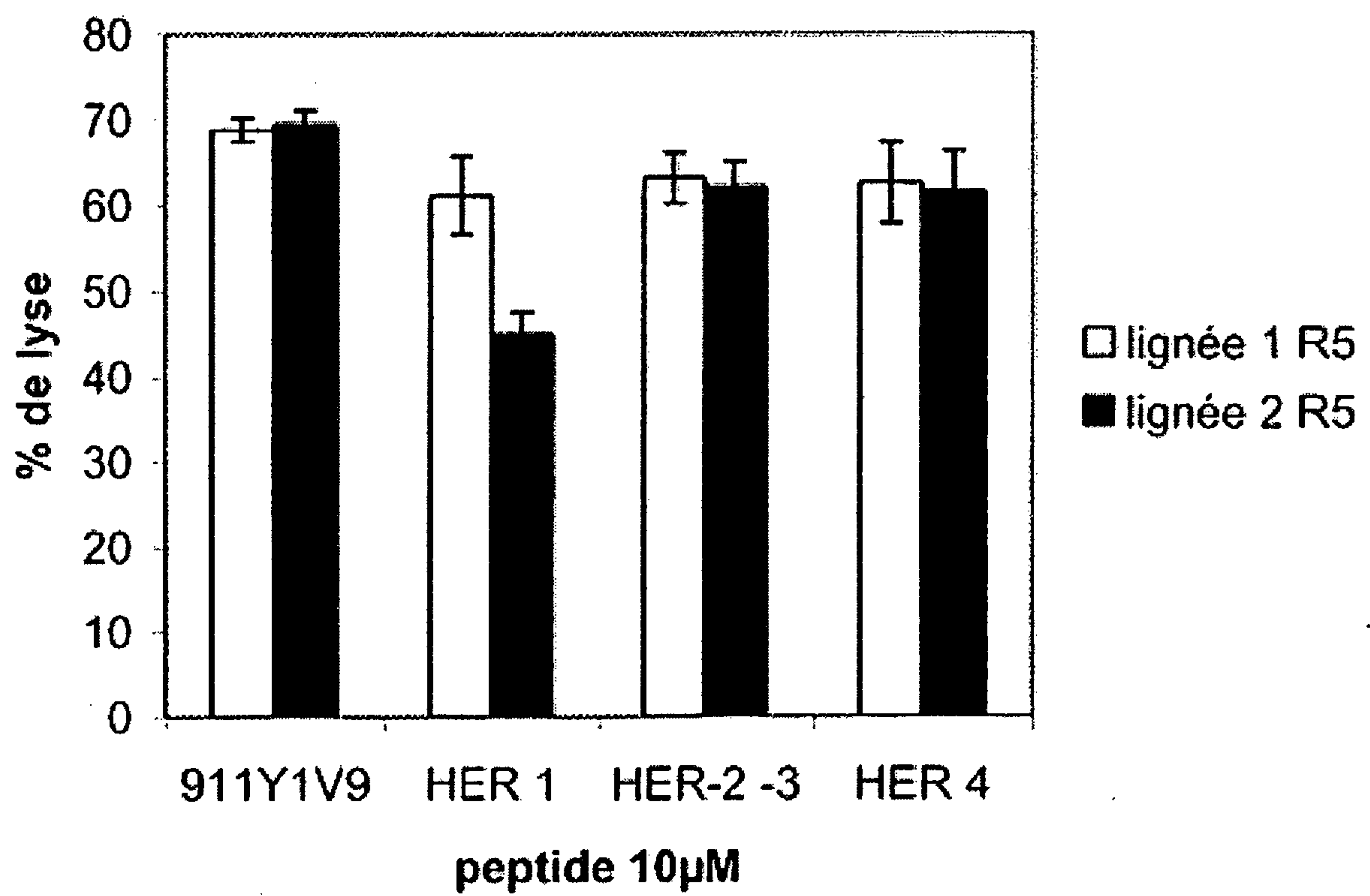


FIG 5

6/6

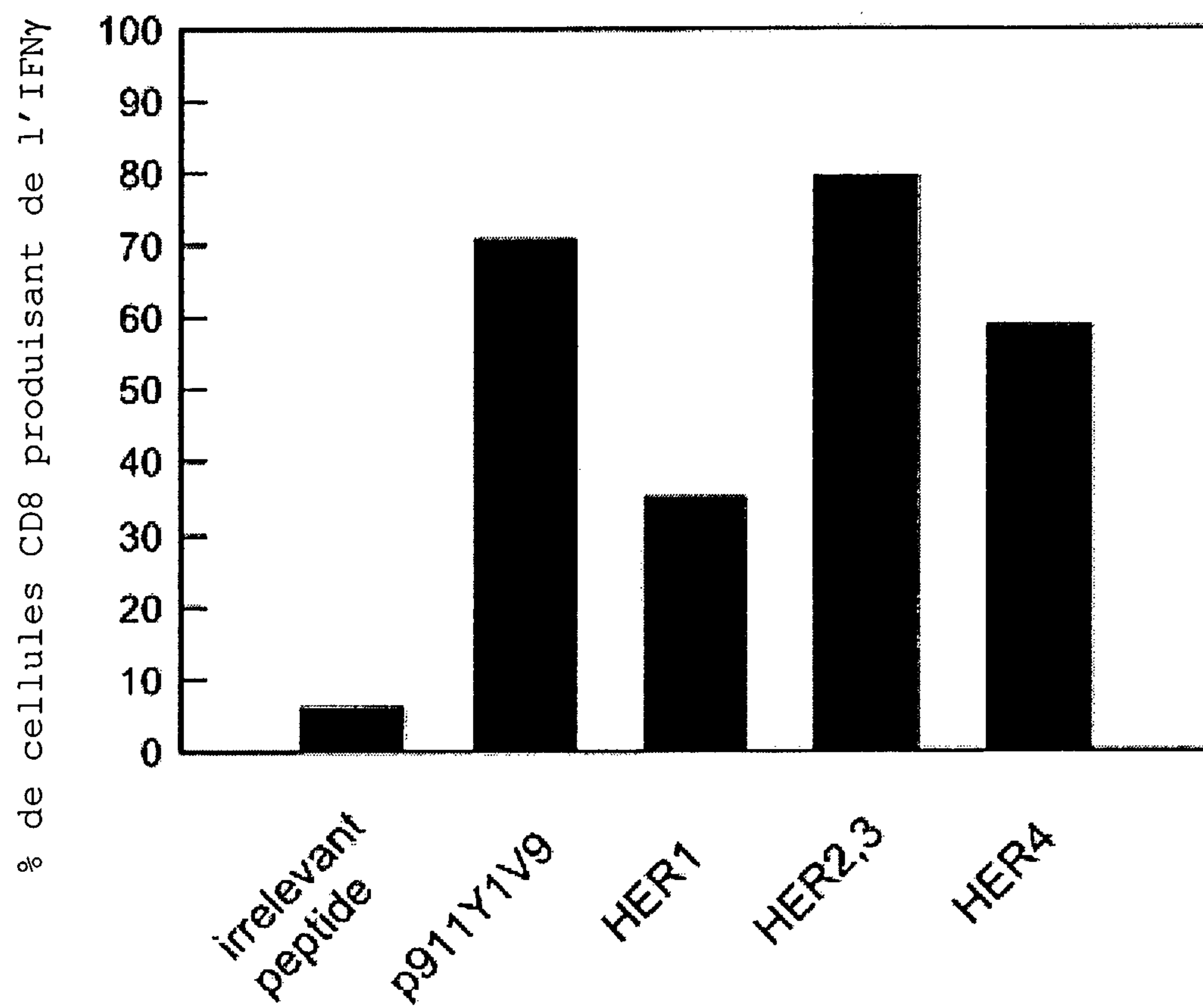


FIG 6

