



(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN  
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2020/12/31  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2021/07/08  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2022/06/28  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2020/088090  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2021/136840  
(30) Priorité/Priority: 2019/12/31 (EP19306799.8)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/54* (2006.01)  
(71) Demandeur/Applicant:  
PEPTINOV, FR  
(72) Inventeurs/Inventors:  
DESALLAIS, LUCILLE, FR;  
SALLES, JEAN-PIERRE, FR;  
ZAGURY, JEAN-FRANCOIS, FR  
(74) Agent: BENOIT & COTE INC.

(54) Titre : CONJUGUE IMMUNOGENE DESTINE A INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE DIRIGEE CONTRE L'INTERLEUKINE-6  
(54) Title: IMMUNOGENIC CONJUGATE INTENDED TO INDUCE AN IMMUNE RESPONSE DIRECTED AGAINST INTERLEUKIN-6

(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention concerne un conjugué immunogène comprenant : - une protéine porteuse et - au moins un polypeptide ayant au plus 100 acides aminés comprenant une séquence de 5 à 50 acides aminés de l'interleukine 6 (IL-6) ou du récepteur de l'IL-6 (IL-6R), ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la séquence de 5 à 50 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R, dans lequel le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse et la protéine porteuse est une toxine diphtérique mutante non-toxique.

**Date de soumission :** 2022/06/28

**No de la demande can. :** 3163277

**Abrégé:**

La présente invention concerne un conjugué immunogène comprenant : - une protéine porteuse et - au moins un polypeptide ayant au plus 100 acides aminés comprenant une séquence de 5 à 50 acides aminés de l'interleukine 6 (IL-6) ou du récepteur de l'IL-6 (IL-6R), ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la séquence de 5 à 50 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R, dans lequel le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse et la protéine porteuse est une toxine diphtérique mutante non-toxique.

## CONJUGUE IMMUNOGENE DESTINE A INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE DIRIGEE CONTRE L'INTERLEUKINE-6

---

### Domaine de l'invention

5 La présente invention a pour objet un conjugué immunogène, une composition pharmaceutique, notamment vaccinale, le comprenant, et son utilisation dans une méthode de prévention ou de traitement des maladies liées à une surexpression ou surproduction de l'interleukine-6.

### 10 Arrière-plan technique

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine essentielle impliquée notamment dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules immunitaires.

L'IL-6 est fortement surproduite lors des processus inflammatoires, et cette surproduction est observée dans de nombreuses maladies comme par exemple les  
15 infections, les maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, et aussi le cancer.

L'IL-6 apparaît ainsi comme le signal moteur dans plusieurs maladies inflammatoires. Des études précliniques dans des modèles animaux de maladies humaines ont montré que le blocage de l'activité de l'IL-6 atténue les symptômes ou même empêche complètement l'apparition de la maladie.

20 La cascade de signalisation de l'IL-6 offre plusieurs alternatives pour une intervention thérapeutique, allant des produits biologiques qui bloquent la cytokine ou son récepteur à l'extérieur de la cellule aux petites molécules chimiques qui ciblent les kinases et les facteurs de transcription impliqués à l'intérieur de la cellule. Il est intéressant de noter que chez les patients, les anticorps qui ciblent l'IL-6 peuvent être  
25 utilisés en quantités nettement inférieures par rapport aux anticorps qui bloquent le récepteur de l'IL-6 (IL-6R). En effet, le récepteur soluble à l'IL-6 (sIL-6R) est présent dans le sérum à des concentrations élevées et comme ces récepteurs solubles captent aussi les anticorps neutralisants anti-IL-6R, il faut beaucoup de ces derniers pour qu'ils puissent aussi bloquer les récepteurs membranaires IL-6R à la surface des cellules et  
30 ainsi empêcher la signalisation de l'IL-6.

Les concentrations d'IL-6 sont relativement faibles chez les individus en bonne santé (quelques picogrammes par millilitre de sérum) et les anticorps ciblant directement la cytokine IL-6 n'ont besoin de capturer que les molécules d'IL-6 nouvellement synthétisées et libérées pour être actifs. Le blocage direct de l'IL-6 n'interfère pas avec

les autres cytokines pouvant transmettre des signaux via l'IL-6R et offre donc une inhibition bien spécifique de l'IL-6.

Depuis quelques années, plusieurs classes de produits thérapeutiques ciblant les composants de la voie de signalisation de l'IL-6 ont été développées. L'efficacité des interventions thérapeutiques neutralisant l'IL-6 ou interférant avec sa signalisation a démontré le rôle délétère majeur de l'IL-6 dans un certain nombre de maladies.

Ainsi, le tocilizumab bloqueur de IL-6R, premier anticorps monoclonal développé contre la voie IL-6, est aujourd'hui approuvé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR) active de l'adulte modérée à sévère. D'autres anticorps monoclonaux ciblant IL-6R sont en développement : le sarilumab, approuvé dans la polyarthrite rhumatoïde ; le NI-1201, actuellement en phase d'essais précliniques ; le vobarilizumab, actuellement en essais cliniques de phase II pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et du lupus érythémateux systémique.

Plusieurs anticorps monoclonaux ciblant directement l'IL-6 ont aussi été développés, on peut ainsi citer : le sirukumab, destiné au traitement de la polyarthrite rhumatoïde, de la dépression et du lupus néphrétique (phase II) ; l'olokizumab, destiné au traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn ; le clazakizumab, destiné au traitement du rejet de transplantation d'organes ; le siltuximab, indiqué dans le traitement de la maladie de Castleman et destiné par ailleurs au traitement du myélome multiple.

Toutefois, tous ces traitements d'immunothérapie passive, c'est-à-dire impliquant l'administration d'anticorps, notamment monoclonaux, nécessitent des administrations assez fréquentes et au long cours, ce qui entraîne des contraintes importantes tant en ce qui concerne le confort du patient que les coûts.

Afin de surmonter ces inconvénients, une approche de prévention et de traitement des maladies liées à l'IL-6 basée sur l'immunothérapie active (ou vaccinale) a été développée. Cette approche repose sur l'induction d'une réponse immunitaire humorale à l'aide de polypeptides immunogènes dérivés de l'IL-6 aboutissant à la production d'anticorps anti-IL-6 par le patient lui-même.

Desallais *et al.* (2016) *Sci. Rep.* **6**:19549 décrivent ainsi la production d'anticorps anti-IL-6 humaine neutralisants chez des singes cynomolgus auxquels a été administré un polypeptide dérivé de l'IL-6. Toutefois, les taux d'anticorps obtenus restaient modérés. Un objectif de la présente invention est donc d'améliorer la production d'anticorps anti-IL-6 en immunothérapie active.

### Résumé de l'invention

La présente invention découle de la mise en évidence inattendue, par les inventeurs, que la conjugaison de polypeptides dérivés de l'IL-6 à la protéine porteuse CRM-197 permettait d'augmenter la production d'anticorps anti-IL-6 chez l'individu auquel le  
5 conjugué est administré par rapport à d'autres protéines porteuses.

Ainsi, la présente invention concerne un conjugué immunogène comprenant :

- une protéine porteuse et

- au moins un polypeptide ayant au plus 100 acides aminés comprenant une  
10 séquence de 5 à 50 acides aminés de l'interleukine 6 (IL-6) ou du récepteur de l'interleukine 6 (IL-6R), ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la séquence de 5 à 50 acides aminés de l'IL-6 ou l'IL-6R,

dans lequel l'au moins un polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse et la protéine porteuse est une toxine diphtérique mutante non-toxique.

15 Dans un mode de réalisation particulier du conjugué immunogène tel que défini ci-dessus, le polypeptide est lié à la protéine porteuse via un agent de couplage non peptidique.

La présente invention concerne également le conjugué immunogène tel que défini ci-dessus, pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique, pour  
20 une utilisation dans une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée à une surproduction ou une surexpression de l'IL-6, ou pour une utilisation dans une méthode de vaccination contre l'IL-6 ou l'IL-6R, ou dans une méthode d'induction d'une réponse immunitaire contre l'IL-6 ou l'IL-6R, chez un individu.

La présente invention concerne également une méthode de prévention ou de  
25 traitement d'une maladie liée à une surexpression ou une surproduction de l'IL-6 chez un individu, dans laquelle on administre à l'individu une quantité prophylactiquement ou thérapeutiquement efficace d'un conjugué immunogène tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également une méthode de vaccination contre l'IL-6 ou l'IL-6R ou d'induction d'une réponse immunitaire contre l'IL-6 ou l'IL-6R chez un  
30 individu, dans laquelle on administre à l'individu une quantité efficace d'un conjugué immunogène tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, notamment vaccinale, comprenant à titre de substance active au moins un conjugué immunogène tel que défini ci-dessus, éventuellement en association avec au moins  
35 un véhicule et/ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, tel que définie ci-dessus comprend en outre au moins un adjuvant.

5 La présente invention concerne également la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, tel que définie ci-dessus, pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique, pour une utilisation dans une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée à une surexpression ou une surproduction de l'IL-6, ou pour une utilisation dans une méthode de vaccination contre l'IL-6 ou l'IL-6R, ou dans une méthode d'induction d'une réponse immunitaire  
10 contre l'IL-6 ou l'IL-6R, chez un individu.

La présente invention concerne également une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée à une surexpression de l'IL-6 chez un individu, dans laquelle on administre à l'individu une quantité prophylactiquement ou thérapeutiquement efficace d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-  
15 dessus.

La présente invention concerne également une méthode de vaccination contre l'IL-6 ou l'IL-6R ou d'induction d'une réponse immunitaire contre l'IL-6 ou l'IL-6R chez un individu, dans laquelle on administre à l'individu une quantité efficace d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus.

20 La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un conjugué immunogène tel que défini ci-dessus, comprenant une étape de liaison covalente d'au moins un polypeptide ayant au plus 100 acides aminés comprenant une séquence de 5 à 50 acides aminés de l'interleukine 6 (IL-6) ou du récepteur de l'IL-6 (IL-6R), ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la  
25 séquence de 5 à 50 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R, avec une protéine porteuse qui est une toxine diphtérique mutante non-toxique.

#### Description de la figure

30 La Figure 1 représente le titre<sub>50</sub> moyen d'anticorps anti-hIL-6 (axe des ordonnées, unités arbitraires) en fonction du temps (axes des abscisses, en jours) de 6 groupes de 5 lapins respectivement immunisés par des doses de 5 µg (groupe 1, petits cercles), 7 µg (groupe 2, carrés), 10 µg (groupe 3, triangles orientés vers le haut), 15 µg (groupe 4, triangles orientés vers le bas), 50 µg (groupe 5, losanges) de polypeptide, ou par de la

protéine porteuse CRM197 (groupe 6, grands cercles), aux jours 0, 13, 43 et 73 (flèches).

### Description détaillée

5 A titre préliminaire, on rappellera que l'expression « consistant en » signifie « constitué de », c'est-à-dire que lorsqu'un objet « consiste en » un élément ou plusieurs éléments, l'objet ne peut pas comprendre d'autres éléments que ceux mentionnés. *A contrario*, le terme « comprenant » signifie « incluant », « contenant » ou « englobant », c'est-à-dire que lorsqu'un objet « comprend » un élément ou plusieurs éléments, d'autres  
10 éléments que ceux mentionnés peuvent également être compris dans l'objet. Autrement dit, lorsqu'un objet « comprend » un élément ou plusieurs éléments, il est constitué du ou des plusieurs éléments et éventuellement d'autres éléments que ceux-ci.

15

### *Polypeptide*

#### Définitions

L'interleukine 6 (IL-6), également parfois nommée facteur de stimulation des lymphocytes B 2 (*B-cell stimulatory factor 2, BSF-2*), facteur de différenciation des lymphocytes T cytotoxiques (*CTL differentiation factor, CDF*), facteur de croissance  
20 des hybridomes, ou interféron  $\beta$ -2 (IFN- $\beta$ -2) est bien connue de l'homme du métier. De nombreuses séquences d'IL-6 provenant de diverses espèces animales sont disponibles dans les bases de données de séquence. A titre d'exemple, une IL-6 humaine est décrite dans la base de données UniProt/Swissprot sous la référence P05231 (SEQ ID NO : 1). A titre d'exemple également la sous-unité alpha du récepteur  
25 de l'IL-6 humaine est décrite dans la base de donnée UniProt/Swissprot sous la référence P08887 (SEQ ID NO : 2).

Tels qu'utilisés ici, les termes « peptide » et « polypeptide » sont utilisés dans leur sens le plus large pour désigner une molécule de deux résidus d'acides aminés, ou plus. Les résidus d'acides aminés peuvent être liés par des liaisons peptidiques, ou en variante  
30 par d'autres liaisons, par exemple ester, éther, etc. Toutefois, les résidus d'acides aminés sont de préférence liés entre eux par des liaisons peptidiques.

Telles qu'utilisées ici, les expressions « acide aminé » et « résidu d'acide aminé » englobent les acides aminés naturels et non naturels ou synthétiques, y compris les formes D et L, et les analogues d'acides aminés. Un « analogue d'acide aminé » doit

être compris comme un acide aminé d'origine non naturelle qui diffère d'un acide aminé d'origine naturelle correspondant sur un ou plusieurs atomes. Par exemple, un analogue d'acide aminé de la cystéine peut être l'homocystéine. Toutefois, les acides aminés ou les résidus d'acides aminés sont de préférence naturels.

5 Le polypeptide selon l'invention est tel qu'il doit permettre d'éliciter une réponse immunitaire dirigée contre l'IL-6 ou l'IL-6R ; c'est-à-dire que l'administration d'un tel polypeptide lié à une protéine porteuse, comme la protéine CRM-197 ou la KLH par exemple, à un animal, tel qu'une souris, un rat ou un lapin par exemple, provoque la production d'anticorps dirigés contre l'IL-6 ou l'IL-6R. Le polypeptide selon l'invention  
10 est donc immunogène et comprend un ou plusieurs épitopes de l'IL-6 ou de l'IL-6R. L'homme du métier sait bien comment déterminer si un anticorps est dirigé contre l'IL-6 ou l'IL-6R, notamment en mettant en œuvre un test ELISA.

Comme on l'entend ici, le pourcentage d'identité entre deux séquences peptidiques peut être déterminé en réalisant un alignement optimal sur toute la longueur des  
15 séquences, en déterminant le nombre de positions alignées pour lesquelles les acides aminés sont identiques dans chaque séquence et en divisant ce nombre par le nombre total d'acides aminés dans la plus longue des deux séquences. L'alignement optimal est celui qui donne le pourcentage d'identité le plus élevé entre les deux séquences.

20 Comme on l'entend ici les termes « surproduction » et « surexpression » de l'IL-6 sont considérés équivalents et signifient que l'IL-6 est présente dans l'organisme d'un individu à traiter dans une concentration au-delà de la normale ou en une concentration non physiologique ou pathologique.

### 25 Longueur

Le polypeptide selon l'invention comprend de préférence au plus 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 24, 23, 22, 21 ou 20 acides aminés. De préférence, le polypeptide selon l'invention comprend au moins 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 acides aminés. De préférence, le polypeptide selon l'invention comprend de 10 à 40  
30 acides aminés, plus préférentiellement de 15 à 35 acides aminés.

### IL-6

De préférence, l'IL-6 selon l'invention est sélectionnée dans le groupe constitué de l'IL-6 humaine (hIL-6), de l'IL-6 de souris, de l'IL-6 de singe, en particulier de macaque, de

l'IL-6 de cheval, de l'IL-6 de chien, de l'IL-6 de chat, ou de l'IL-6 de lapin. De manière particulièrement préférée l'IL-6 selon l'invention est l'IL-6 humaine.

### Séquence

5 De préférence, le polypeptide selon l'invention comprend, ou est constitué de, une séquence d'au moins 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R. De préférence, le polypeptide selon l'invention comprend, ou est constitué de, une séquence d'au plus 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ou 10 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R. De préférence, le polypeptide selon l'invention  
10 comprend, ou est constitué de, une séquence de 6 à 40, de 7 à 35, ou de 8 à 30 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R.

De préférence, le polypeptide selon l'invention comprend, ou est constitué de, une séquence de 7 à 35 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R, ou une séquence variante présentant au moins 90% d'identité avec la séquence de 7 à 35 acides aminés de l'IL-  
15 6 ou de l'IL-6R.

Le polypeptide selon l'invention peut notamment être tel que décrit dans la demande internationale WO2013/021284, qui est incorporée ici par référence.

De préférence, la séquence d'acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R selon l'invention comprend au moins 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 acides aminés, ou la totalité, des  
20 séquences 58-78, 73-94, 96-111, 122-141, ou 172-189 de l'IL-6. De préférence, la séquence d'acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R selon l'invention est constituée de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 acides aminés, ou de la totalité, des séquences 58-78, 73-94, 96-111, 122-141, ou 172-189 de l'IL-6.

De préférence, la séquence d'acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6 selon l'invention  
25 comprend au plus 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14 ou 13 acides aminés des séquences 58-78, 73-94, 96-111, 122-141, ou 172-189 de l'IL-6.

La numérotation ci-dessus est basée sur la séquence de référence contenant le peptide signal, et présentée à titre d'exemple pour l'IL-6 humaine et l'IL-6 murine :

- IL-6 humaine (hIL-6) :

30 Séquence 58 à 78 : RYIIDGISALRKETCNKSNMC (SEQ ID NO : 3)

Séquence 73 à 94 : NKSNMCESSKEALAENNLNLPK (SEQ ID NO : 4)

Séquence 96 à 111 : AEKDGCFFQSGFNEETC (SEQ ID NO : 5)

Séquence 122 à 141 : FEVYLEYLQNRFSSEEQAR (SEQ ID NO : 6)

Séquence 172 à 189 : NASLLTKLQAQNLWLQDM (SEQ ID NO : 7)

Séquence 196 à 212 : RSFKEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO : 8)

- IL-6 murine (mIL-6) :

Séquence 58 à 78 : VLWEIVEMRKELCNGNSDCMN (SEQ ID NO : 9)

Séquence 73 à 94 : NSDCMNNDDALAENNLKLP EIG (SEQ ID NO : 10)

5 Séquence 96 à 111 : NDGCYQTGYNQEICLL (SEQ ID NO : 11)

Séquence 122 à 141 : SYLEYMKNNLKDKNKKDKARV (SEQ ID NO : 12)

Séquence 172 à 189 : ALLTDKLESQKEWLRTKT (SEQ ID NO : 13)

Séquence 196 à 211 : SLEEFKLVTLRSTRQT (SEQ ID NO : 14).

10 Ainsi, de préférence, le polypeptide défini ci-dessus comprend au moins 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 acides aminés, ou la totalité, ou est constitué de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 acides aminés, ou de la totalité, d'une séquence d'IL-6 sélectionné dans le groupe constitué des séquences :

- RYIIDGISALRKETCNKSNMC,
- NKSNMCESSKEALAENNLNLPK,
- 15 • AEKDGC FQSGFNEETC,
- FEVYLEYLQNR FESSEEQAR,
- NASLLTKLQAQNQWLQDM, et
- RSFKEFLQSSLRALRQM.

Par ailleurs, le polypeptide selon l'invention peut comprendre plusieurs répétitions, par exemple 2, 3, 4, 5, 10 ou 20 répétitions, respectivement de la séquence d'IL-6 ou d'IL-6R ou de la séquence variante définie ci-dessus.

### Séquence variante

25 Une séquence variante selon l'invention, qui a au moins 75% d'identité avec la séquence d'IL-6 ou d'IL-6R selon l'invention, aura de manière préférentielle au moins 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% d'identité avec la séquence d'IL-6 ou d'IL-6R selon l'invention. De manière très préférentielle, cette séquence variante aura au plus 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ou 10 acides aminés.

### 30 Cyclisation

De préférence, le polypeptide selon l'invention est cyclisé.

Le polypeptide selon l'invention peut être cyclisé, c'est-à-dire que l'ensemble du polypeptide forme un cycle ou qu'une portion de celui-ci forme un cycle, selon des méthodes de tout type connues de l'homme du métier.

En fonction des groupes fonctionnels présents dans le polypeptide, cette cyclisation peut s'effectuer de plusieurs manières différentes, comme par exemple : de son extrémité C-terminale à extrémité N-terminale, de son extrémité N-terminale à une chaîne latérale, d'une chaîne latérale à son extrémité C-terminale ou encore entre  
5 deux chaînes latérales. Les groupements des chaînes latérales impliqués dans la cyclisation sont notamment les groupes  $-NH_2$ ,  $-COOH$  et  $-SH$ .

Parmi les diverses modalités de cyclisation de polypeptides, on peut citer la formation d'une liaison peptidique entre les deux extrémités, N- et C-terminales du polypeptide, la lactamisation, la lactonisation ou la formation d'un pont disulfure entre deux  
10 cystéine (C) du polypeptide. En particulier, lors de la formation d'un pont disulfure inter-cystéine, c'est-à-dire entre les radicaux  $-SH$  de deux cystéines, les cystéines peuvent être déjà présentes dans la séquence d'IL-6 ou d'IL-6R, ou bien être ajoutées au sein de ces séquences, pour former des séquences variantes, ou à leur(s) extrémité(s) N-terminale et/ou C-terminale.

15

#### Modifications

Le polypeptide selon l'invention peut comprendre des modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations, des méthylation, des acylations, notamment par des acides gras ou par un groupe acétyle, des amidations, ou des  
20 phosphorylations. Par exemple, l'extrémité N-terminale du polypeptide selon l'invention peut être acétylée ou son extrémité C-terminale peut être modifiée par amidation.

#### Séquences additionnelles

25 De préférence, le polypeptide selon l'invention comprend une ou plusieurs séquences additionnelles, en plus de la séquence de l'IL-6 ou de l'IL-6R selon l'invention.

Ces séquences additionnelles selon l'invention peuvent notamment apporter des caractéristiques physico-chimiques permettant une présentation structurale améliorée ou une solubilité améliorée du polypeptide selon l'invention par rapport à  
30 un polypeptide similaire mais qui ne comprendrait pas ces séquences additionnelles.

Les séquences additionnelles selon l'invention peuvent notamment comprendre une ou plusieurs séquences de lien, ou de liaison, peptidique (« peptide linker »), utiles pour une liaison notamment à une molécule porteuse. De telles séquences de lien

peptidique comprennent typiquement de 1 à 10, notamment de 1 à 6, et en particulier 2 à 5 acides aminés.

Une séquence de lien particulièrement préférée selon l'invention est la séquence EGEZ (SEQ ID NO : 15), où Z est un acide aminé permettant la liaison à la protéine porteuse, notamment choisi dans le groupe constitué de cystéine (C), tyrosine (Y), et lysine (K), plus particulièrement dans le groupe constitué de cystéine (C) et tyrosine (Y). De manière particulièrement préférée Z est une tyrosine (Y). Avantageusement, la séquence EGEZ améliore la solubilité tout en maintenant de bonnes réponses immunitaires comme les Exemples 4, 5, et 6 ci-après le montrent.

10 Une autre séquence de lien préférée est un acide aminé Z permettant la liaison à la protéine porteuse, notamment choisi dans le groupe constitué de cystéine (C), tyrosine (Y), et lysine (K), plus particulièrement dans le groupe constitué de cystéine (C) et tyrosine (Y). De manière particulièrement préférée Z est une tyrosine (Y).

Par ailleurs, la ou les séquences additionnelles peuvent aussi comprendre des épitopes appartenant à d'autres protéines que l'IL-6 ou l'IL-6R, permettant d'élucider ou de générer une réponse immunitaire dirigée contre ces autres protéines.

15 En outre, les séquences additionnelles selon l'invention peuvent également comprendre des séquences d'épitope(s) T exogène(s), préférablement universel(s). Avantageusement, ces séquences d'épitopes T additionnelles permettent de renforcer l'immunogénicité du polypeptide selon l'invention.

### Préparation

Le polypeptide selon l'invention peut être préparé par toute méthode connue dans l'état de la technique et notamment par synthèse chimique. Il est également possible de le préparer par la voie recombinante dans des cellules eucaryotes ou procaryotes.

### *Protéine porteuse*

La protéine porteuse selon l'invention est une toxine diphtérique mutante non-toxique, c'est-à-dire une anatoxine diphtérique obtenue par mutagenèse. Avantageusement, cette toxine diphtérique mutante est pharmaceutiquement acceptable.

La protéine porteuse selon l'invention est de préférence choisie dans le groupe constitué de CRM197, de CRM176, de CRM228, de CRM45, de CRM9, de CRM102, de CRM103, et de CRM107.

De manière particulièrement préférée, la protéine porteuse selon l'invention est CRM197.

CRM197 est une forme génétiquement détoxifiée de la toxine diphtérique. Elle possède une mutation unique en position 52, substituant une glycine (G) par un acide glutamique (E), ce qui provoque la perte de l'activité ADP-ribosyltransférase. Elle conserve en revanche tous les radicaux amines des lysines (K) disponibles pour la conjugaison. CRM197 possède 535 acides aminés (58,4 kDa) et consiste en deux sous-unités reliées par des ponts disulfures. Elle est décrite sous le numéro d'accèsion GenBank 1007216A (SEQ ID NO : 16). Elle peut être produite de manière recombinante chez *Corynebacterium diphtheria*, et également par d'autres bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* ou *Escherichia coli*.

#### Agent de couplage

De préférence l'agent de couplage selon l'invention est non peptidique.

L'agent de couplage peut être hétérobifonctionnel, tel que l'ester de N-γ-maleimidobutyryl-oxy succinimide (GMBS) et le dérivé sulfo-GMBS, l'ester du m-maléimidobenzoyl-n-hydroxysuccinimide (MBS) et le dérivé sulfo-MBS, le succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), le sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC), un carbodiimide, le bisdiazonium-benzidine (BDB) ou le glutaraldéhyde. L'utilisation des agents de couplage est notamment décrite dans le chapitre "Production of Antisera Using Peptide Conjugates" de l'ouvrage de référence "The Protein Protocols Handbook" (2002) qui est incorporé ici par référence.

Lorsque le GMBS, le MBS, le SMCC ou le sulfo-SMCC sont utilisés, ils sont de préférence fixés sur une cystéine (C), qui si elle n'est pas présente dans la séquence du peptide, peut être ajoutée, notamment à son extrémité N-terminale ou C-terminale.

#### Conjugué

De préférence, le polypeptide du conjugué immunogène selon l'invention comprend, ou est constitué de, la séquence SSKEALAENNLNLPK (SEQ ID NO : 17), plus particulièrement la séquence ESSKEALAENNLNLPK (SEQ ID NO : 18), et encore plus particulièrement la séquence ESSKEALAENNLNLPKC (SEQ ID NO : 19), la séquence AESSKEALAENNLNLPKC (SEQ ID NO : 20) ou la séquence CESSKEALAENNLNLPKC (SEQ ID NO : 21), à laquelle est éventuellement ajoutée, du côté C-terminal, la séquence

additionnelle de lien peptidique EGEZ ou Z définie ci-dessus. De préférence également ce polypeptide est lié à la protéine porteuse CRM197 définie ci-dessus par un agent de couplage défini ci-dessus.

Ainsi, de préférence, le conjugué immunogène tel que défini ci-dessus est de formule

5 (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

- le polypeptide est constitué de la séquence AESSKEALAENNLNLPKC,
- 10 • la protéine porteuse est CRM197,
- le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse via l'agent de couplage N-γ-maléimidobutyryl- (GMB),
- les parenthèses indiquent que le polypeptide est cyclisé par formation d'une liaison peptidique entre la cystéine (C) C-terminale et l'alanine (A) N-terminale,
- 15 • les crochets indiquent qu'au moins un polypeptide est lié à la protéine porteuse.

De préférence également, le conjugué immunogène tel que défini ci-dessus est de formule (II) suivante :



20

(II)

dans laquelle :

- le polypeptide est constitué de la séquence CESSKEALAENNLNLPKC-(X)<sub>i</sub>-Z,
- la protéine porteuse est CRM197,
- le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse via l'agent de couplage N-γ-maléimidobutyryl- (GMB),
- 25 • les parenthèses indiquent que la partie de séquence CESSKEALAENNLNLPKC du polypeptide est cyclisée par formation d'un pont disulfure entre la cystéine (C) C-terminale et la cystéine (C) N-terminale,
- Acétyl- indique que la fonction -NH<sub>2</sub> libre de la cystéine (C) N-terminale est protégée par un groupement acétyl par formation d'une liaison amide,
- 30 • (X) représente une séquence peptidique quelconque de 1 à 5 acides aminés, en particulier EGE,
- i vaut 0 ou 1,
- Z représente une tyrosine (Y) ou une cystéine (C),



- Acétyl- indique que la fonction  $-NH_2$  libre de la cystéine (C) N-terminale est protégée par un groupement acétyl par formation d'une liaison amide,
  - (X) représente une séquence peptidique quelconque de 1 à 5 acides aminés, en particulier EGE,
- 5
- i vaut 0 ou 1,
  - les crochets indiquent qu'au moins un polypeptide est lié à la protéine porteuse.

#### *Composition pharmaceutique, notamment vaccinale*

10 Parmi les adjuvants qui peuvent être administrés conjointement avec le conjugué immunogène défini ci-dessus ou qui peuvent être présent dans la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, définie ci-dessus on peut citer l'Alun (hydroxyde d'alumine), le MONTANIDE™ ISA 51 VG, le MONTANIDE™ ISA 720 VG, toute émulsion eau dans huile ou toute émulsion huile dans eau, ainsi que de manière

15 générale tous les adjuvants connus dans la littérature scientifique.

Il est également possible d'administrer conjointement avec le conjugué immunogène selon l'invention ou d'ajouter à la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon l'invention, des immuno-modulateurs, comme le MP40 par exemple.

#### 20 *Applications thérapeutiques*

Le conjugué immunogène selon l'invention ou la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, le comprenant, est à visée d'immunisation active et peut être administrées pour soigner toutes les maladies liées à une surproduction ou une surexpression de la cytokine inflammatoire IL-6 en induisant la production d'anticorps

25 qui se lieront à l'IL-6 surproduite ou surexprimé pour l'empêcher d'agir.

De préférence, les maladies liées à la surproduction ou à la surexpression de l'IL-6 selon l'invention sont sélectionnées dans le groupe constitué de :

- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique ou la colite ulcéreuse ;
- 30
- Les maladies arthritiques comme la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile, le psoriasis arthritique, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde réfractaire, l'arthrite chronique non rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante ;
  - Les maladies inflammatoires osseuses chroniques ou liées à IL-6, en particulier l'ostéoporose ou toute maladie de résorption de l'os ;

- Les maladies inflammatoires chroniques ou liées à IL-6 associées à une infection comme le choc septique, le choc endotoxinique, la septicémie, l'hépatite C, le paludisme, le SIDA ou d'autres infections liées au VIH ;
- Les maladies inflammatoires chroniques ou liées à l'IL-6 du système cardio-vasculaire, comme l'athérosclérose, les lésions liées à la reperfusion suite à une ischémie, les maladies coronariennes, les vascularites, comme la maladie de Behcet ou la granulomatose de Wegener ;
- Les maladies auto-immunes comme la sclérodermie, la sclérodermie systémique, le lupus érythémateux, en particulier disséminé, la sclérose en plaques, ou le psoriasis ;
- 10 - Les maladies liées aux greffes, notamment les réactions de type greffon contre l'hôte, les rejets de greffe, et les traumatismes ;
- Les allergies, en particulier l'asthme allergiques, et les désordres cutanés liés à des réactions d'hypersensibilité retardée ;
- Les immunodéficiences, comme l'immunodéficiences idiopathique (CVID en anglais) ;
- 15 - Les maladies inflammatoires chroniques ou liées à IL-6 de l'appareil respiratoire, en particulier le syndrome de détresse respiratoire ou la fibrose pulmonaire ;
- Les cancers qui ont une composante inflammatoire chronique ou liée à IL-6, comme le plamocytome, le cancer colo-rectal, le cancer de l'ovaire, les syndromes lymphoprolifératifs, le myélome multiple, en particulier le myélome multiple réfractaire, ou les syndromes myéloprolifératifs ;
- 20 - Le diabète, en particulier le diabète juvénile ;
- Les amyloses, en particulier la maladie d'Alzheimer ;
- Les uvéites, en particulier leur forme récurrente ;
- 25 - La cachexie ; et
- L'endométriose.

#### *Administration*

De préférence, la quantité de conjugué immunogène selon l'invention administrée par administration, c'est-à-dire la dose unitaire de conjugué immunogène administrée, est de 3 ng à 3g, plus préféablement de 300 ng à 900 µg, encore plus préféablement de 15 µg à 450 µg et le plus préféablement de 30 µg à 300 µg. Ces doses unitaires de conjugué correspondent respectivement à des doses unitaires de polypeptide selon l'invention de préférence de 1 ng à 1 g, plus préféablement de

100 ng à 300 µg, encore plus préférablement de 5 µg à 150 µg et le plus préférablement de 10 µg à 100 µg.

De préférence, la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon l'invention comprend le conjugué immunogène selon l'invention à une dose de 3 ng à 3g, plus préférablement de 300 ng à 900 µg, encore plus préférablement de 15 µg à 450 µg et le plus préférablement de 30 µg à 300 µg. De préférence également la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon l'invention comprend le polypeptide selon l'invention à une dose de 1 ng à 1 g, plus préférablement de 100 ng à 300 µg, encore plus préférablement de 5 µg à 150 µg et le plus préférablement de 10 µg à 100 µg.

Avantageusement, les doses selon l'invention permettent de favoriser la production d'anticorps dirigés contre le polypeptide par rapport aux anticorps dirigés contre la protéine porteuse, c'est-à-dire de favoriser un ratio du titre des anticorps dirigés contre le polypeptide sur le titre des anticorps dirigés contre la protéine porteuse supérieur à 1. Sans vouloir être lié par une théorie particulière, les inventeurs pensent que s'il y a trop d'anticorps produits contre la protéine porteuse, ces anticorps bloquent la réponse immunitaire lors d'immunisations suivantes réalisées à l'aide du conjugué immunogène selon l'invention, il est donc avantageux de garder un titre de réponse anticorps contre la protéine porteuse suffisamment faible par rapport à celui des anticorps induit contre le polypeptide.

L'administration du conjugué immunogène est possible par voie intraveineuse, intradermique, sous-cutanée, intra-musculaire, mucosale, notamment intra-nasale, ou intra-péritonéale.

Le régime d'administration ou posologique peut aller d'une administration tous les 15 jours à une fois par an pour l'amorçage (*priming*), jusqu'à ce qu'une bonne réponse anticorps anti-IL-6 ou anti-IL-6R apparaisse, puis avec des rappels espacés par exemple tous les 2 mois à une fois par an pour que les anticorps gardent une activité bénéfique satisfaisante.

De préférence, l'individu selon l'invention est un animal, notamment un mammifère, en particulier un humain. De préférence, l'individu selon l'invention surproduit ou surexprime l'IL-6 ou est à risque de surproduire ou de surexprimer l'IL-6. De préférence, l'individu selon l'invention est âgé de 50 ans ou plus, de 60 ou plus, de 70 ou plus, de 80 ou plus, ou de 90 ans ou plus.

L'invention sera davantage explicitée à l'aide des exemples non limitatifs qui suivent.

## EXEMPLES

### Exemple 1

Le peptide (CESSKEALAENNLNLPKC)Y (SEQ ID NO : 22), synthétisé chimiquement, est  
5 conjugué à la protéine porteuse CRM197 (Pfenex, USA) d'une part et à la protéine  
porteuse KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*, SIGMA) d'autre part.

Le peptide correspond à la zone 78-93 de l'IL-6 humaine (partie soulignée ci-dessus)  
avec ajout d'une cystéine et d'une tyrosine en C-terminal. La cystéine permet une  
10 cyclisation (partie entre parenthèses) avec la cystéine présente en N-terminal du  
peptide via un pont disulfure. La conjugaison aux protéines porteuses est réalisée via  
la tyrosine avec de la bis-diazo-benzidine (BDB, PolyPeptide Laboratories, Strasbourg  
France) selon des méthodes standards.

La production de ces conjugués conduit généralement à un rapport massique  
standard peptide/protéine porteuse de l'ordre de 1:2 pour le KLH et pour la CRM197  
15 comme déterminé par la méthode de dosage des acides aminés *Amino-Acid*  
*Analysis* (AAA). En d'autres termes, il est déterminé que pour 300 microgrammes de  
masse totale de peptide conjugué à la protéine porteuse, il y a 200 microgrammes en  
KLH et 100 microgrammes en peptide, et il y a 200 microgrammes en CRM197 et 100  
microgrammes en peptide pour le conjugué à CRM197.

20 Ces conjugués sont testés dans une expérience d'immunisation chez la souris Swiss  
(Charles River Laboratoires, Ecully, France) en utilisant pour adjuvant le MONTANIDE™  
ISA 51 VG (ou ISA 51 en abrégé) (SEPPIC, France), en administrant un mélange  
contenant 50 microlitres de MONTANIDE™ ISA 51 VG pour 50 microlitres de conjugué,  
par voie intramusculaire, avec une dose injectée de 300 microgrammes de conjugué  
25 pour chaque immunisation. Deux groupes de 8 souris sont ainsi immunisés à J0, J14,  
J28, J42 contre le peptide conjugué au KLH et contre le peptide conjugué à la  
CRM197. Les souris sont sacrifiées à J54, leur sang prélevé, et les sera ainsi préparés  
sont évalués pour leurs taux d'anticorps anti-IL-6 humaine mesurés par ELISA (Desallais  
*et al.* (2016) *Sci. Rep.* **6**:19549). Au jour du sacrifice, les souris se portent bien (poil bien  
30 luisant, poids conservé, selles normales), ce qui montre que l'immunisation contre les  
conjugués immunogène n'a pas d'effet toxique à la dose utilisée.

Les titres en anticorps anti-IL-6 obtenus pour les 2 groupes, KLH et CRM197, sont  
résumés dans le tableau ci-après :

	CRM197	KLH
Moyenne titres	20000	4788
Médiane titres	10980	1608

On voit que pour des doses en conjugués identiques, les titres anticorps anti-IL-6 sont nettement supérieurs avec le conjugué CRM197 par rapport au conjugué KLH.

5

### Exemple 2

Les mêmes composés que pour l'Exemple 1 sont testés lors d'immunisations en sous-cutané de singes macaques réalisées à J1, J15, J30, J45, avec pour adjuvant le MONTANIDE™ ISA 51 VG, en un mélange 250 microlitres de MONTANIDE™ ISA 51 VG/250 microlitres de conjugué. 300 microgrammes de conjugué au KLH et 300 microgrammes de conjugué à la CRM197 sont administrés lors de chaque immunisation respectivement à deux groupes de 4 animaux.

Des prélèvements de sang et préparation de sérum sont faits à J57, et les titres d'anticorps dirigés contre l'IL-6 humaine mesurés par ELISA. Tout au long de l'expérimentation, les singes ont été évalués sur le plan de leur état général et ils se portent bien (activité normale, appétit satisfaisant, poids conservé, selles normales), ce qui montre que l'immunisation contre les conjugués immunogène n'a pas d'effet toxique à la dose utilisée.

Les titres en anticorps anti-IL-6 obtenus pour les 2 groupes, KLH et CRM197, sont résumés dans le tableau ci-après :

	CRM197	KLH
Moyenne titres	20510	7498
Médiane titres	17514	12116

On voit à nouveau que les titres obtenus après immunisation contre le conjugué CRM197 sont nettement plus élevés en moyenne et en médiane que ceux obtenus pour le KLH.

25

Exemple 3

Le peptide cyclo(LTKLQAQNQWLQDMC) (SEQ ID NO : 23), synthétisé chimiquement, est conjugué à la protéine porteuse CRM197 ou KLH via le groupe -SH de la cystéine. La conjugaison est réalisée avec l'agent de couplage bi-fonctionnel N-γ-maleimidobutyl succinimide (GMBS, Thermo-Fisher 22309) selon des méthodes standards (« *User guide GMBS and SulfoGMBS* » Thermo-Fisher). Le peptide comprend la séquence 176-189 de l'IL-6 humaine (partie soulignée ci-dessus), à laquelle est ajoutée une cystéine en C-terminal, et est cyclisé par lactamisation (partie entre parenthèses ci-dessus).

10 La production de ces conjugués conduit à un ratio massique standard peptide/protéine porteuse estimé de 1:2 pour le KLH et 1:2 pour la CRM197. En d'autres termes, il est déterminé que pour 300 microgrammes de masse totale de peptide conjugué, il y a 200 microgrammes en KLH et 100 microgrammes en peptide pour le conjugué au KLH, et de même pour le conjugué à la CRM197 (100 microgrammes en peptide pour 200 microgrammes en CRM197).

Ces conjugués sont testés dans une expérience d'immunisation chez la souris en utilisant pour adjuvant, le MONTANIDE™ ISA 51 VG (50 microlitres de MONTANIDE™ ISA 51 VG pour 50 microlitres de conjugué), par voie intramusculaire avec une dose de 450 microgrammes de conjugué pour chaque immunisation. 2 groupes de 8 souris sont immunisés à J0, J14, J28, J42 contre le peptide conjugué au KLH et contre le peptide conjugué à la CRM197. Les souris sont sacrifiées à J54, leur sang prélevé, et les sera ainsi préparés sont évalués pour leurs taux d'anticorps anti-IL-6 humain mesurés par ELISA. Au jour du sacrifice, les souris se portent bien (poil bien luisant, poids conservé, selles normales), ce qui montre que l'immunisation contre les conjugués immunogène n'a pas d'effet toxique à la dose utilisée.

Les titres anticorps anti-hIL-6 obtenus pour les 2 groupes, KLH et CRM197, sont résumés dans le tableau ci-après :

	CRM197	KLH
Moyenne titres	12350	8480
Médiane titres	7608	4772

30 On voit que pour des doses en conjugués identiques, les titres anticorps sont encore une fois nettement supérieurs avec le conjugué CRM197 par rapport au conjugué KLH.

#### Exemple 4

Le peptide (C**LDKQIRYIIDGISALRKETC**)EGEC (SEQ ID NO : 24), synthétisé chimiquement, est conjugué à la protéine porteuse CRM197 d'une part ou KLH d'autre part. Le peptide comprend la séquence 53 à 71 de l'IL-6 humaine (partie soulignée ci-dessus) encadrée par deux cystéines qui permettent la cyclisation du peptide par formation d'un pont disulfure (partie entre parenthèse ci-dessus). La conjugaison est réalisée via la cystéine C-terminale à l'aide de l'agent de couplage bi-fonctionnel N-γ-maleimidobutryl succinimide (GMBS). Un peptide de liaison (linker) de séquence EGEC est présent.

La production de ces conjugués conduit à un rapport massique standard peptide/protéine porteuse estimé de 1:2 pour le KLH et 1:2 pour la CRM197. En d'autres termes, il est déterminé que pour 300 microgrammes de masse totale de peptide conjugué, il y a 200 microgrammes en KLH et 100 microgrammes en peptide pour le conjugué au KLH, et de même pour le conjugué à la CRM197 (100 microgrammes en peptide pour 200 microgrammes en CRM197).

Ces conjugués sont testés lors d'immunisations de deux groupes de 6 lapins New Zealand White (NZW) (Charles River) réalisées à J1, J15, J45, avec pour adjuvant le MONTANIDE™ ISA51 VG, en sous-cutané. Dans le cas présent les lapins sont immunisés contre 450 microgrammes de conjugué (peptide-KLH ou bien peptide-CRM197) lors de chaque immunisation. Le volume injecté en MONTANIDE™ ISA 51 VG est de 400 microlitres (200 microlitres de MONTANIDE™ ISA 51 VG avec 200 microlitres de conjugué).

Des prélèvements de sang et la préparation de sérum à partir de ces prélèvements sont faits à J60. Les titres d'anticorps dirigés contre l'IL-6 humaine sont mesurés par ELISA. Au jour du sacrifice, les lapins se portent bien (poil bien luisant, poids conservé, selles normales), ce qui montre que l'immunisation contre les conjugués immunogène n'a pas d'effet toxique à la dose utilisée.

Les titres obtenus pour les 2 groupes, KLH et CRM197, sont résumés dans le tableau ci-après :

	CRM197	KLH
Moyenne titres	11192	8756
Médiane titres	6328	5640

On voit à nouveau que les titres obtenus après immunisation contre le conjugué CRM197 sont nettement plus élevés en moyenne et en médiane que ceux obtenus pour le KLH.

5

#### Exemple 5

Les peptides (A) (CLQAQNQWLQDMC)Y (SEQ ID NO: 25) et (B) (CLQAQNQWLQDMC)EGEY (SEQ ID NO: 26), synthétisés chimiquement, sont conjugués à la protéine porteuse CRM197. Le peptide comprend la séquence s'étendant des résidus 179 à 189 de l'IL-6 humaine (partie soulignée ci-dessus), avec des cystéines ajoutées aux extrémités N- et C-terminale pour la cyclisation. Le peptide est cyclisé par formation d'un pont disulfure entre les cystéines (partie soulignée), et le couplage à la CRM197 de ces peptides est réalisé par la tyrosine terminale à l'aide L'agent de couplage bi-fonctionnel utilisé est le BDB. Le peptide (B) est identique au peptide (A) à l'exception d'une séquence de liaison (linker) constituée du tripeptide de séquence EGE.

La production de ces conjugués conduit à un rapport masse standard peptide/protéine porteuse estimé de 1:2. En d'autres termes, il est déterminé que pour 300 microgrammes de poids total de conjugué, il y a 200 microgrammes de CRM197 et 100 microgrammes de peptide.

Ces composés sont testés lors d'immunisations de deux groupes de 6 souris réalisées à J1, J15, J45, avec pour adjuvant le MONTANIDE™ ISA 51 VG, en sous-cutané. Dans le cas présent les souris sont immunisées contre 300 microgrammes de conjugué lors de chaque immunisation. Le volume injecté en MONTANIDE™ ISA 51 VG est de 200 microlitres (100 microlitres de MONTANIDE™ ISA 51 VG avec 100 microlitres de conjugué).

Des prélèvements de sang et la préparation de sérum à partir de ces prélèvements sont faits à J54. Les titres d'anticorps dirigés contre l'IL-6 humaine sont mesurés par ELISA. Au jour du sacrifice, les souris se portent bien (poil bien luisant, poids conservé, selles normales), ce qui montre que l'immunisation contre les conjugués immunogène n'a pas d'effet toxique à la dose utilisée.

Les titres obtenus pour les 2 groupes sont résumés dans le tableau ci-après :

	Avec peptide de liaison EGE	Sans peptide de liaison
Moyenne des titres	3675	2718
Médiane des titres	1752	1146

- 5 On voit que les titres obtenus après immunisation contre le peptide possédant le peptide de liaison EGE sont nettement plus élevés en moyenne et en médiane que ceux obtenus pour le peptide sans peptide de liaison.

#### Exemple 6

- 10 Les peptides (A) (CFQSGFNEETC)Y (SEQ ID NO : 27) et (B) (CFQSGFNEETC)EGEY (SEQ ID NO : 28), synthétisés chimiquement, sont conjugués à la protéine porteuse CRM197. Les peptides comprennent la séquence 101 à 111 de l'IL-6 humaine (partie soulignée ci-dessus, les cystéines (C) sont natives). Le peptide est cyclisé par formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines. Le couplage à la CRM197 de ces peptides est réalisé
- 15 par la tyrosine terminale à l'aide de l'agent de couplage bi-fonctionnel BDB. La production de ces conjugués conduit à un rapport massique standard peptide/protéine porteuse estimé de 1:2. En d'autres termes, il est déterminé que pour 300 microgrammes de poids total de conjugué, il y a 200 microgrammes de CRM197 et 100 microgrammes de peptide.
- 20 Ces composés sont testés lors d'immunisations de deux groupes de 6 souris réalisées à J1, J15, J45, avec pour adjuvant le MONTANIDE™ ISA 51 VG, en sous-cutané. Dans le cas présent les souris sont immunisées contre 300 microgrammes de conjugué lors de chaque immunisation. Le volume injecté en MONTANIDE™ ISA 51 VG est de 200 microlitres (100 microlitres MONTANIDE™ ISA 51 VG avec 100 microlitres de conjugué).
- 25 Des prélèvements de sang et la préparation de sérum à partir de ces prélèvements sont faits à J54. Les titres d'anticorps dirigés contre l'IL-6 humaine sont mesurés par ELISA. Au jour du sacrifice, les souris se portent bien (poil bien luisant, poids conservé, selles normales), ce qui montre que l'immunisation contre les conjugués immunogène n'a pas d'effet toxique à la dose utilisée.

30

Les titres obtenus pour les 2 groupes sont résumés dans le tableau ci-après :

	Avec peptide de liaison EGE	Sans peptide de liaison
Moyenne des titres	2648	980
Médiane des titres	1083	368

On voit à nouveau que les titres obtenus après immunisation contre le peptide possédant le peptide de liaison EGE sont nettement plus élevés en moyenne et en médiane que ceux obtenus pour le peptide sans peptide de liaison.

### Exemple 7

Le peptide (CESSKEALAENNLNLPKC)Y (SEQ ID NO : 22), synthétisé chimiquement, est conjugué à la protéine porteuse CRM197 (Pfenex, USA) comme cela a déjà été décrit dans l'Exemple 1. Il est testé à 3 doses lors d'immunisations en sous-cutané de 3 groupes de 10 singes macaques réalisées à J0, J15, J30, J45, J60, et J75 avec pour adjuvant le MONTANIDETM ISA 51 VG. en un mélange 250 microlitres de MONTANIDETM ISA 51 VG/250 microlitres de conjugué : à 600 microgrammes de conjugué (soit 200 µg de peptide), à 300 microgrammes de conjugué (soit 100 µg de peptide), à 150 microgrammes de conjugué (soit 50 µg de peptide).

Des prélèvements de sang et préparation de sérum sont faits à J30, J45, J60, J75 et J90 et les titres d'anticorps dirigés contre l'IL-6 humaine et contre la CRM197 sont mesurés par ELISA. Dans les tableaux suivants, les titres anti-IL6 et anti-CRM197, ainsi que les ratios(anti-IL6/anti-CRM197) sont présentés pour les 3 groupes.

	Groupe recevant 200 µg de peptide conjugué		
	Anti-IL6	anti-CRM	Ratio
J0	-	-	-
J15	-	-	-
J30	3921	7070	55%
J45	23214	20000	116%
J60	31358	44453	71%
J75	44143	81086	54%
J90	42907	88428	49%
Moyenne			69%

Groupe recevant 100 µg de peptide conjugué			
	Anti-IL6	anti-CRM	ratio
J0	-	-	-
J15	-	-	-
J30	2452	3900	63%
J45	12000	6680	180%
J60	10185	9300	110%
J75	14192	13343	106%
J90	16841	14866	113%
Moyenne			114%

Groupe recevant 50 µg de peptide conjugué			
	Anti-IL6	anti-CRM	ratio
J0	-	-	-
J15	-	-	-
J30	3320	3360	99%
J45	7445	3760	198%
J60	12000	12683	95%
J75	33625	11163	301%
J90	39115	22428	174%
Moyenne			173%

De manière surprenante, on voit que le groupe immunisé à 150 µg de conjugué (soit 50 µg de peptide présent dans le conjugué), c'est-à-dire la dose la plus faible, présente des titres anti-IL6 aussi bons que ceux des groupes immunisés à 600 µg ou 300 µg de conjugué, et que notamment les ratios(anti-IL6/anti-CRM197) sont meilleurs pour ce groupe à tous les temps que pour le groupe 600 µg de conjugué (correspondant à 200 µg de peptide présent dans le conjugué).

#### 10 Exemple 8

Le peptide (CESSKEALAENNLNLPKC)Y (SEQ ID NO : 22), synthétisé chimiquement, est conjugué à la protéine porteuse CRM197 (Pfenex, USA) comme cela a déjà été décrit dans l'Exemple 1. Il est testé à 5 doses différentes lors d'immunisations en sous-cutané de groupes de 5 lapins immunisés : 5 µg de peptide (soit 15 µg de conjugué), 7 µg de peptide (soit 21 µg de conjugué), 10 µg de peptide (soit 30 µg de conjugué), 15 µg de peptide (soit 45 µg de conjugué), 50 µg de peptide (soit 150 µg de conjugué). Les lapins ont été immunisés à J0, J13, J43, et J73 par injection sous-cutanée d'un mélange de 250 microlitres de MONTANIDE™ ISA 51 VG/250 microlitres de conjugué.

Les sérums ont été prélevés à J0, J13, J30, J43, J60, J73, J90, et J104 et les réponses anticorps contre l'IL6 mesurées par ELISA. Les résultats des immunisations sont donnés dans le graphe de la **Figure 1**, où chaque point représente la moyenne des titres obtenus pour les 5 lapins du groupe.

- 5 On voit que la CRM197 seule n'induit pas de production d'anticorps anti-IL6, mais que toutes les groupes immunisés avec du peptide conjugué à la CRM197 produisent des anticorps anti-IL6. De manière surprenante, on observe que la dose de 10 µg de peptide (soit 30 µg de conjugué) donne des niveaux d'anticorps équivalents à la dose de 50 µg de peptide (soit 150 µg de conjugué).

10

#### Récapitulatif des identifiants de séquence :

SEQ ID NO :	Description
1	IL-6 humaine
2	Sous-unité alpha du récepteur de l'IL-6 humaine
3	RYIIDGISALRKETCNKSNMC
4	NKSNMCESSKEALAENNLNLPK
5	AEKDGCQSGFNEETC
6	FEVYLEYLQNRFESSEEQAR
7	NASLLTKLQAQNQWLQDM
8	RSFKEFLQSSLRALRQM
9	VLWEIVEMRKELCNGNSDCMN
10	NSDCMNNDDALAENNLKLPEIG
11	NDGCYQTGYNQEICLL
12	SYLEYMKNLKDKNKKDKARV
13	ALLTDKLESQKEWLRTKT
14	SLEEFKVTLRSTRQT
15	EGEX
16	CRM197
17	SSKEALAENNLNLPK
18	ESSKEALAENNLNLPK
19	ESSKEALAENNLNLPKC
20	AESSKEALAENNLNLPKC
21	CESSKEALAENNLNLPKC
22	CESSKEALAENNLNLPKCY
23	LTKLQAQNQWLQDMC
24	CIDKQIRYIIDGISALRKETCEGEC
25	CLQAQNQWLQDMCY
26	CLQAQNQWLQDMCEGEY
27	CFQSGFNEETC
28	CFQSGFNEETCEGEY

15

## REVENDICATIONS

1. Conjugué immunogène comprenant :

- 5 - une protéine porteuse et  
- au moins un polypeptide ayant au plus 100 acides aminés comprenant une séquence de 5 à 50 acides aminés de l'interleukine 6 (IL-6) ou du récepteur de l'interleukine 6 (IL-6R), ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la séquence de 5 à 50 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R,  
10 dans lequel le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse et la protéine porteuse est une toxine diphtérique mutante non-toxique.

2. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la protéine porteuse est CRM197.

15

3. Conjugué immunogène selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le polypeptide comprend une séquence de 7 à 35 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R ou une séquence variante présentant au moins 90% d'identité avec la séquence de 7 à 35 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R.

20

4. Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le polypeptide est cyclisé.

5. Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel le polypeptide comprend aux moins 5 acides aminés d'une séquence sélectionnée dans le groupe constitué des séquences :

25

- RYIIDGISALRKETCNKSNMC,
- NKSNMCESSKEALAENNLNLPK,
- AEKDGCFCQSGFNEETC,
- 30 • FEVYLEYLQNRFEESSEEQAR,
- NASLLTKLQAQNQWLQDM, et
- RSFKEFLQSSLRALRQM.

30

6. Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel le polypeptide est lié à la protéine porteuse via un agent de couplage non peptidique.

35

7. Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 6, de formule (I) suivante :



5

(I)

dans laquelle :

- le polypeptide est constitué de la séquence AESSKEALAENNLNLPKC,
- la protéine porteuse est CRM197,
- le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse via l'agent de couplage N-γ-maléimidobutyryl- (GMB),
- les parenthèses indiquent que le polypeptide est cyclisé par formation d'une liaison peptidique entre la cystéine (C) C-terminale et l'alanine (A) N-terminale,
- les crochets indiquent qu'au moins un polypeptide est lié à la protéine porteuse.

15

8. Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 6, de formule (II) suivante :



(II)

20

dans laquelle :

- le polypeptide est constitué de la séquence CESSKEALAENNLNLPKC-(X)<sub>i</sub>-Z,
- la protéine porteuse est CRM197,
- le polypeptide est lié de manière covalente à la protéine porteuse via l'agent de couplage N-γ-maléimidobutyryl- (GMB),
- les parenthèses indiquent que la partie de séquence CESSKEALAENNLNLPKC du polypeptide est cyclisée par formation d'un pont disulfure entre la cystéine (C) C-terminale et la cystéine (C) N-terminale,
- Acétyl- indique que la fonction -NH<sub>2</sub> libre de la cystéine (C) N-terminale est protégée par un groupement acétyl par formation d'une liaison amide,
- (X) représente une séquence peptidique quelconque de 1 à 5 acides aminés,
- i vaut 0 ou 1,
- Z représente une tyrosine (Y) ou une cystéine (C),
- les crochets indiquent qu'au moins un polypeptide est lié à la protéine porteuse.

30

**9.** Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 8, pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique ou dans une méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée à une surproduction de l'IL-6, chez un individu.

5

**10.** Conjugué immunogène selon l'une des revendications 1 à 8, pour une utilisation dans une méthode de vaccination contre l'IL-6 ou l'IL-6R, ou dans une méthode d'induction d'une réponse immunitaire contre l'IL-6 ou l'IL-6R, chez un individu.

10 **11.** Composition pharmaceutique, notamment vaccinale, comprenant à titre de substance active au moins un conjugué immunogène tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, éventuellement en association avec au moins un véhicule et/ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

15 **12.** Composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon la revendication 11, comprenant en outre au moins un adjuvant.

**13.** Composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon la revendication 11 ou 12, pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique ou une  
20 méthode de prévention ou de traitement d'une maladie liée à une surproduction de l'IL-6, chez individu.

**14.** Composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon la revendication 11 ou 12, pour une utilisation dans une méthode de vaccination contre l'IL-6 ou l'IL-6R,  
25 ou dans une méthode d'induction d'une réponse immunitaire contre l'IL-6 ou l'IL-6R, chez un individu.

**15.** Procédé de préparation d'un conjugué immunogène tel que défini dans l'une des revendication 1 à 8, comprenant une étape de liaison covalente d'au moins un  
30 polypeptide ayant au plus 100 acides aminés comprenant une séquence de 5 à 50 acides aminés de l'interleukine 6 (IL-6) ou du récepteur de l'IL-6 (IL-6R), ou une séquence variante présentant au moins 75% d'identité avec la séquence de 5 à 50 acides aminés de l'IL-6 ou de l'IL-6R avec une protéine porteuse qui est une toxine diphtérique mutante non-toxique.

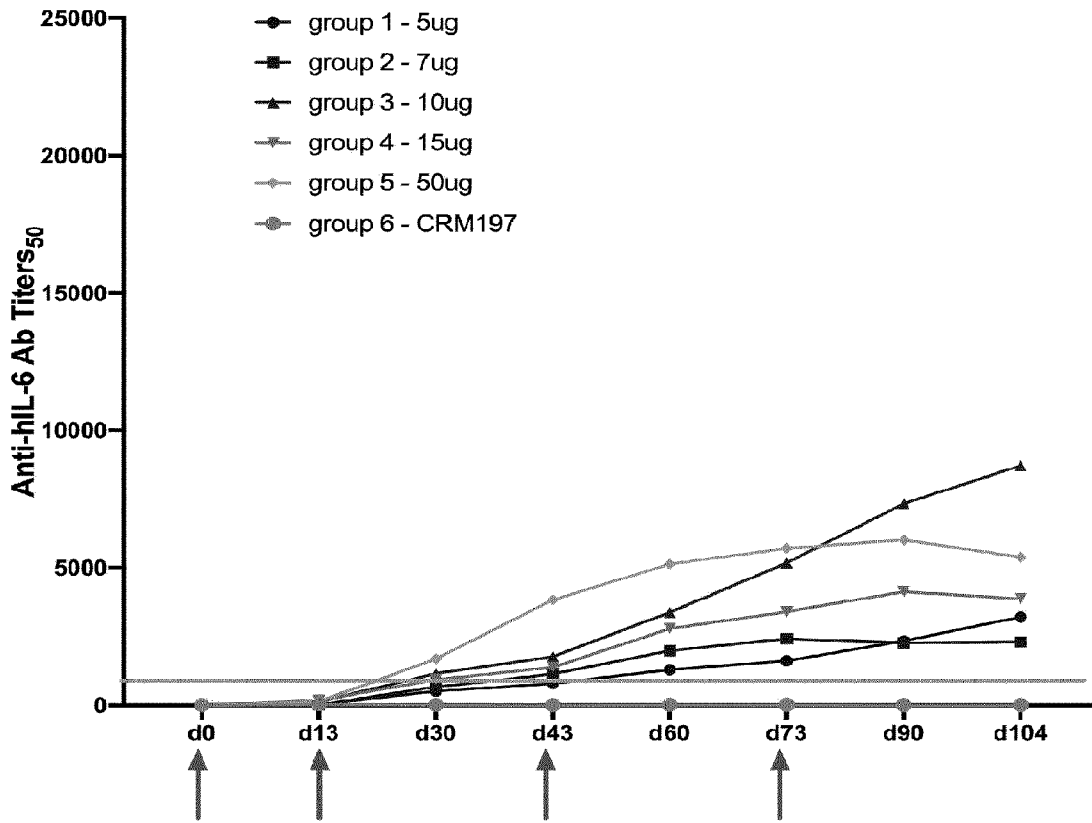


Figure 1