

(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
23 décembre 2009 (23.12.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/153463 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/000744
- (22) Date de dépôt international :
19 juin 2009 (19.06.2009)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0803466 20 juin 2008 (20.06.2008) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 25, rue Leblanc, Bâtiment « Le Ponant D », F-75015 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
KERZERHO, Jérôme [FR/FR]; 190A rue des Landes, F-78400 Chatou (FR). MAILLERE, Bernard [FR/FR]; 26 rue Augusta Holmes, F-78000 Versailles (FR). FAVRY, Emmanuel [FR/FR]; 80 rue d'Auerstaedt, F-91600 Savigny Sur Orge (FR).
- (74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
 - avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h)
 - avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a)

(54) Title : IMMUNOGENIC PEPTIDES DERIVED FROM THE MIDKINE PROTEIN, AS AN ANTICANCER VACCINE

(54) Titre : PEPTIDES IMMUNOGENES ISSUS DE LA PROTEINE MIDKINE COMME VACCIN ANTICANCEREUX

(57) Abstract : A peptide derived from the Midkine protein, comprising at least one CD4⁺ T or CD8⁺ T epitope restricted by the HLA molecules predominant in the Caucasian population, or a polynucleotide encoding said peptide, as an anticancer vaccine or as a reagent for immunomonitoring of the cellular response against Midkine over the course of a cancer or of an anticancer treatment.

(57) Abrégé : Peptide issu de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ restreint aux molécules HLA prépondérantes dans la population caucasienne ou polynucléotide codant ledit peptide, comme vaccin anticancéreux ou comme réactif pour l'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine au cours d'un cancer ou d'un traitement anticancéreux.



WO 2009/153463 A1

PEPTIDES IMMUNOGENES ISSUS DE LA PROTEINE MIDKINE COMME VACCIN ANTICANCEREUX

L'invention est relative à l'utilisation comme vaccin anticancéreux, de peptides issus de la protéine Midkine capables d'induire des lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ reconnaissant ladite protéine Midkine chez la majorité des individus de la population caucasienne, dans de nombreux types de cancers.

L'invention est également relative à l'utilisation de tels peptides reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ spécifiques de la protéine Midkine, chez la majorité des individus de la population caucasienne, dans de nombreux types de cancers, comme réactif pour l'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine au cours d'un cancer ou d'un traitement anticancéreux.

Les cellules tumorales expriment un ensemble de protéines que les cellules saines n'expriment pas ou peu, ou qui ne sont retrouvées que dans quelques types cellulaires. Ces protéines étant préférentiellement exprimées dans les cellules tumorales, peuvent constituer un antigène tumoral, c'est-à-dire une protéine présente dans la tumeur et qui induit une réponse immunitaire capable de reconnaître les tumeurs et idéalement de les éliminer. Cette réponse peut être aussi bien une réponse en anticorps dans la mesure où l'antigène est membranaire qu'une réponse cellulaire impliquant des lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺. La plupart des antigènes tumoraux sont intracellulaires et induisent une réponse cellulaire. Ils constituent des cibles privilégiées pour le développement de vaccins.

Les lymphocytes T contribuent à la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les tumeurs. Ils peuvent être induits spontanément chez les patients atteints de cancer et infiltrer les tumeurs, donnant dans des cas rares une régression spontanée. Ils peuvent être induits par des vaccins qui sont prévus pour faciliter leur recrutement. Il existe deux sortes de lymphocytes T impliqués dans l'immunité anti-tumorale. Les lymphocytes T CD8⁺ sont cytotoxiques (CTL CD8⁺) et peuvent lyser les cellules tumorales. La lyse de cellules lors de leur reconnaissance fait intervenir la perforine et les granzymes. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent l'antigène tumoral sous la forme de peptides, dénommés épitopes T CD8⁺, que leur présentent les molécules HLA de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) présentes à la surface des tumeurs. Les lymphocytes T CD4⁺ de type auxiliaire reconnaissent les antigènes de tumeurs

sous la forme de peptides, dénommés épitopes T CD4⁺, que leur présentent les molécules HLA de classe II. La reconnaissance par les lymphocytes T CD4⁺ des tumeurs peut se faire de manière directe lorsque les tumeurs expriment des molécules de classe II ou de manière indirecte grâce à la capture de débris cellulaires par les

5 cellules dendritiques qui sont des cellules qui possèdent un nombre élevé de molécules HLA de classe II à leur surface. Les lymphocytes T CD4⁺ impliqués dans l'immunité anti-tumorale jouent un rôle multiple dans le contrôle des tumeurs et en particulier interviennent dans le recrutement et le maintien des CTL CD8⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle d'activation des cellules dendritiques (DC) via un mécanisme

10 dépendant du CD40. Ils augmentent la sécrétion d'IL-12 par les DC et l'expression à leur surface de molécules de co-stimulation ou d'adhésion (I-CAM-1, CD80, CD86). Cette activation permet le recrutement de CTL. En outre, les résultats observés chez des souris n'exprimant pas de molécules de classe I indiquent également que les lymphocytes T auxiliaires exercent un contrôle des tumeurs via des mécanismes indé-

15 pendants des CTL probablement via l'activation de macrophages. Enfin, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent eux-mêmes être cytotoxiques. Les cellules dendritiques interviennent également dans l'immunité anti-tumorale en initiant cette réponse. Les lymphocytes T naïfs spécifiques des tumeurs sont en effet recrutés et activés par les cellules dendritiques et non par les cellules tumorales.

20 La découverte des premiers antigènes tumoraux dans les années 1990 a été à l'origine de nombreuses études sur ces protéines exprimées dans les tumeurs. En fonction de leur mode d'expression, les antigènes tumoraux ont été répartis en plusieurs catégories.

** Les antigènes spécifiques des tumeurs*

25 Il s'agit du groupe d'antigènes le plus important, qui a été initialement découvert dans les mélanomes mais qui en fait est exprimé dans de nombreuses tumeurs. Ces antigènes sont également appelés "Cancer Testis" en raison de leur expression dans les testicules qui est le seul tissu sain qui les expriment. Certains de ces antigènes sont également exprimés dans le placenta ou les ovaires. Les testicules

30 et le placenta étant dépourvus de molécules HLA conventionnelles, ces antigènes ne sont pas visibles pour les lymphocytes T dans les tissus sains. Les principaux antigènes sont les antigènes MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, GAGE, LAGE et SSX.

**Les antigènes de différenciation*

Les antigènes de différenciation sont des protéines exprimées par des tumeurs et par le tissu cellulaire qui lui a donné naissance. Les exemples les plus connus sont des antigènes du mélanome qui sont également exprimés dans les mélanocytes. Il s'agit des tyrosinases (TYRO, TRP-1 et TRP-2) et des antigènes Gp100 et MELAN-A/MART-1. D'autres antigènes de différenciation sont également connus pour des tumeurs de la prostate (kallikreine-4 et PSA) ou le cancer de l'appareil digestif (CEA).

**Les antigènes surexprimés*

Les antigènes surexprimés sont des protéines fortement exprimées dans de nombreuses cellules tumorales alors que leur taux d'expression est peu élevé dans les cellules normales. C'est le cas de l'antigène HER-2/neu qui est retrouvé chez environ 30 % des carcinomes du sein et des ovaires et dans certains carcinomes du colon et du rein. La P53 est également fréquemment surexprimée dans les tumeurs. Cette protéine qui inhibe la multiplication cellulaire est normalement très rapidement recyclée dans les cellules normales. La télomérase (hTERT) est trouvée chez plus de 80 % des tumeurs, quelle que soit leur origine tissulaire alors qu'elle est absente ou exprimée à bas bruit dans les cellules normales. L'action de la télomérase sert à compenser la réduction des télomères qui a lieu lors de la division cellulaire. Le maintien d'une longueur constante des télomères par la télomérase favorise la prolifération cellulaire et donc la tumorigénèse. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) comme la protéine Survivine constituent une famille de protéines qui, en inhibant les caspases, inhibent la mort cellulaire.

**Autres antigènes*

Les autres catégories d'antigènes sont les antigènes résultant d'une mutation ou d'un arrangement génétique (MUM-1, CDK4, bêta-caténine, HLA-A2, BCR-ABL, CASP-8) et les antigènes tumoraux d'origine virale (protéines E6 et E7 des papillomavirus impliqués dans le cancer du col de l'utérus).

Bien que de nombreux antigènes tumoraux aient été déjà découverts, les vaccins pour lutter contre le cancer ne sont pas au point. Les essais de vaccination demeurent assez décevants et les cas de régression provoqués par les vaccins sont rares. Ces échecs résultent d'une faible immunogénicité des antigènes identifiés ou de

mécanismes d'échappement qui font que la tumeur n'exprime plus l'antigène cible. Les antigènes ciblés ne sont souvent pas vitaux pour la cellule si bien que l'échappement tumoral peut avoir lieu. Les antigènes identifiés l'ont été principalement sur des mélanomes et ne sont pas adaptés aux nombreux autres cancers. Il y a
5 peu d'antigènes connus ayant un large spectre d'expression et qui permettent de disposer d'un vaccin adapté à de nombreux cancers. Il s'agit principalement des antigènes surexprimés tels que la télomérase et la survivine (Demande Internationale PCT WO 2007/036638).

Pourtant, il existe de nombreuses protéines préférentiellement exprimées dans les cellules tumorales quelle que soit leur origine et qui donc pourraient
10 constituer des vaccins adaptés à de nombreux cancers. Pour que ces protéines aient un intérêt vaccinal, il est nécessaire de montrer qu'elles induisent des lymphocytes T capables de reconnaître des cellules tumorales qui expriment ces protéines. Il est en effet possible qu'elles ne soient que faiblement immunogènes en raison de méca-
15 nismes de tolérance ou l'absence d'épitopes T dans leur séquence. Il est également possible qu'elles soient capables d'induire une réponse immunitaire mais que les cellules induites ne reconnaissent pas les tumeurs. Les épitopes T issus de ces protéines peuvent en effet ne pas être présentés à la surface des cellules tumorales en raison d'un niveau insuffisant d'expression ou d'un mauvais apprêtement des
20 protéines dans les cellules tumorales.

La protéine Midkine (MDK), également dénommée NEGF2 (*Neurite outgrowth-promoting factor 2*), a été mise en évidence en 1988, en tant que protéine de cellules de carcinome embryonnaire induite par l'acide rétinolique (Kadomatsu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 151, 1312-1318; pour une revue voir
25 <http://www.midkine.org>). Chez l'homme, le gène de la Midkine est localisé sur le chromosome 11 en position 11p11.2. Il comporte 4 exons et a une taille de 3,5kb ; la séquence codante correspond au numéro d'accès NCBI M69148 (SEQ ID NO : 1 dans la liste de séquences en annexe). La région 5' régulatrice contient un site de réponse à l'acide rétinolique et deux sites de réponses au suppresseur de tumeur WT1 (*Wilms Tumor Suppressor 1*).
30 Le site de réponse à l'acide rétinolique est responsable de l'induction de l'expression de la Midkine par l'acide rétinolique, alors que les sites de réponses à WT1 interviennent dans la diminution de l'expression par WT1. Un variant

d'épissage de la protéine Midkine humaine, dénommé INSP106, a également été décrit (Demande Internationale PCT WO 2004/052928).

La Midkine est une protéine de 143 acides aminés riche en résidus basiques et qui possède cinq ponts disulfure [(37,61) ; (45,70) ; (52,74) ; (84,116) ; (94,126)]. La séquence humaine correspond au numéro d'accès SwissProt P21741 (Figure 1 et SEQ ID NO: 2 dans la liste des séquences en annexe). Elle est exprimée sous la forme d'un précurseur comportant un peptide signal de 22 acides aminés (Figure 1). Elle présente environ 50 % d'homologie avec la protéine Pleiotrophine. La structure de la Midkine a été résolue par RMN en 1997. La protéine comporte deux domaines différents, chacun constitué par trois feuillets bêta anti-parallèles maintenus par des ponts disulfure; les deux domaines sont reliés par une région flexible. L'activité biologique (croissance des neurites, fibrinolyse et migration des cellules nerveuses) ne nécessite que le domaine C-terminal. Ce domaine est conservé et est retrouvé depuis la drosophile jusqu'à l'homme, ce qui confirme son rôle fonctionnel. Il comporte également deux sites de fixation de l'héparine. On connaît au moins quatre récepteurs capables de lier la Midkine ce qui lui confère de nombreuses activités: les membres de la famille Syndecan qui sont des protéoglycanes comportant des héparine sulfates; PTP ζ qui est un protéoglycane comportant des chondroïtine sulfate; ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*); LRP qui est un membre de la famille des récepteurs des LDL.

Chez un individu normal, la Midkine est principalement exprimée lors de l'embryogénèse avec un pic d'expression en milieu de gestation. La Midkine intervient dans le développement des neurones. Elle provoque la croissance des neurites et la migration des cellules nerveuses. Elle intervient dans le développement de la jonction neuromusculaire et la protection des neurones. Lors de l'embryogénèse, la Midkine intervient dans le développement des dents, des poumons, des reins et des os. Les souris déficientes pour le gène de la Midkine sont viables et elles ne sont affectées que dans des fonctions neuronales en accord avec le rôle de la Midkine dans le développement du système nerveux. Il a également été observé que les souris rendues déficientes pour le gène de la Midkine sont moins affectées que les souris témoin par l'induction de néphrites. Elles sont également moins sujettes à la restenose (rétrécissement des artères du à la prolifération des tissus artériels endommagés).

La Midkine est surexprimée dans de nombreuses tumeurs alors que chez des individus sains et adultes son expression est moindre et locale (intestin grêle, cerveau). La Midkine fait partie des 40 gènes les plus exprimés dans les tumeurs par rapport aux tissus sains (Velculescu *et al.*, Nat. Genet., 1999, 23, 387-388). La

5 Midkine est surexprimée dans environ 80 % des cas de nombreux cancers humains en particulier de carcinomes. Son expression élevée a été observé notamment dans les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du colon, du pancréas, de la thyroïde, des poumons, du sein, de la vessie, de l'utérus, de l'ovaire, de la prostate, les carcinomes hépatocellulaires, les ostéosarcomes, les neuroblastomes, les glioblastomes, les astro-

10 cytomes, les leucémies et les tumeurs de Wilm (Moon *et al.*, Gynecologic Oncology, 2003, 88, 289-297; Hidaka *et al.*, Leukemia Res., 2007, 8, 1045-1051; Maeda *et al.*, Br. J. Cancer, 2007, 97, 405-411; Ren *et al.*, World J. Gastroenterol., 2006, 12, 2006-2010). Une expression élevée a été corrélée avec un mauvais pronostic dans les cancers de la vessie, les glioblastomes et les neuroblastomes (O' Brien, Cancer Res.,

15 1996, 56, 2515-2518). En outre, la surexpression de la Midkine est corrélée avec une résistance accrue à la chimiothérapie dans des lignées de cellules humaines de cancer gastrique. Son expression n'est pas uniquement tissulaire. Un niveau élevé de Midkine a été observé dans le sérum de plus de 60 % des patients atteints de carcinomes (Muramatsu *et al.*, J. Biochem., 2003, 132, 259-371). Ce niveau diminue lorsque la

20 tumeur est retirée. La présence de Midkine dans le sérum pourrait donc avoir une valeur diagnostique. La Midkine semble posséder de nombreuses activités en relation avec la tumorigénèse. Elle possède en effet une activité transformante, anti-apoptotique, mitogénique, angiogénique, fibrinolytique et chimiotactique (Kadomatsu *et al.*, Cancer Letters, 2004, 127-143). Il a été montré qu'une stratégie antisens ciblant

25 le gène de la Midkine supprime la tumorigénèse d'un carcinome chez la souris (Takei *et al.*, Cancer Research, 2001, 61, 8486-8491).

Du fait de ses nombreuses activités biologiques, la Midkine ou ses modulateurs (inhibiteurs) sont utiles pour stimuler l'angiogénèse, l'hématopoïèse, prévenir l'athérosclérose et la resténose, inhiber l'apoptose, dans la prévention et le

30 traitement de pathologies inflammatoires, cardiaques (infarctus du myocarde), cérébrales, hépatiques, nerveuses, rénales, oculaires (rétinopathies), neurofibromateuses, respiratoires (asthme et hyperplasie pulmonaire), post-chirurgicales (Demandes

américaines US 2003/0072739, US 2003/0185794, US 2004/0077579, US 2005/0079151, US 2006/0148738 et US 2005/0130928; Demande européenne EP 1832296, Demandes Internationales PCT WO 2007/055397 et WO 2000/031541 ; Brevets US 5,629,284 ; US 6,383, 480 ; US 6,572,851).

5 En outre, du fait de l'expression fréquente de la Midkine dans les tumeurs, associée à la présence de la protéine dans le sang et l'urine, ainsi que de l'existence d'un polymorphisme de la Midkine associé au risque de cancer, la Midkine représente un marqueur pour l'évaluation du risque, le diagnostic et le pronostic du cancer (Brevet US 7,090,983 et Demandes US 2003/0149534 et US 2004/0219614).

10 La détection de la Midkine est notamment effectuée à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques d'une Midkine tronquée correspondant aux positions 23 à 25 et 82 à 143 du précurseur de la Midkine (Demande américaine US 2004/0219614). Le promoteur de la Midkine est également utilisé dans des stratégies de gène-suicide.

15 En revanche, l'immunogénicité de la protéine Midkine n'a pas été étudiée.

Les Inventeurs ont montré que la protéine Midkine qui possède une expression préférentielle dans les tumeurs contenait des peptides capables d'induire des lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ spécifiques reconnaissant la protéine Midkine exprimée par les cellules tumorales dans de nombreux types de cancers, chez la majorité des individus de la population caucasienne. Ces peptides représentent des candidats potentiels pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique contre les cancers, étant donné qu'ils sont susceptibles d'induire une réponse T CD4⁺ et T CD8⁺ dirigée contre la tumeur, chez la majorité des patients vaccinés, dans la mesure où : (i) ils sont issus d'un antigène exprimé par de nombreuses tumeurs, (ii) ils sont aptes à induire des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques reconnaissant l'antigène exprimé par les tumeurs, et (iii) ils sont reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ chez la majorité des individus de la population caucasienne du fait qu'ils prennent en compte le polymorphisme des molécules HLA et sont restreints aux molécules HLA prépondérantes dans la population caucasienne.

30 En outre, ces peptides qui sont reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ spécifiques d'un antigène tumoral exprimé par la majorité des tumeurs, sont utiles pour l'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la

Midkine au cours de l'évolution d'un cancer et notamment après un traitement anti-cancéreux (chirurgical, chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie).

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'un peptide issu de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ restreint aux molécules HLA prépondérantes dans la population caucasienne ou d'un polynucléotide codant ledit peptide, pour la préparation d'un vaccin anti-cancéreux, destiné au traitement des cancers associés à une surexpression tumorale de ladite protéine Midkine.

Définitions

10 - On entend par "peptide issu de la Midkine" aussi bien la protéine Midkine (précurseur de 143 acides aminés ou protéine mature (positions 23 à 143 du précurseur) qu'un fragment peptidique d'au moins 8 acides aminés consécutifs de ladite protéine. On entend par « Midkine », une protéine Midkine issue de n'importe quel mammifère ; de préférence, il s'agit de la protéine humaine. Les positions des peptides issus de la Midkine sont indiquées en référence à la séquence humaine
15 (SwissProt P21741, Figure 1 et SEQ ID NO: 2).

- On entend par « molécule HLA prépondérante dans la population caucasienne » ou « molécule HLA prépondérante », une molécule HLA I (HLA-A HLA-B ou HLA-C) ou HLA II prépondérante. Il s'agit des molécules HLA-A, HLA-B
20 et HLA-C comprenant une chaîne alpha codée par un allèle dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, comme précisé au Tableau I ci-dessous.

Tableau I : Fréquence génique (allélique*)/phénotypique d'HLA I

Allèles	Europe		USA		Afrique	Asie	
	France	Allemagne	Caucasien	Afro-américain	Sénégal	Inde	Japon
A1	14,6/27,1	17/31,1	16,6/30,4	5,3/10,3	4,9/9,6	11,1/21,0	0,7/1,4
A2	20,9/37,4	26,6/46,1	27,9/48,0	17,3/31,6	18,6/33,7	12,1/22,7	24,1/42,4
A3	9,2/17,6	14,2/26,4	11,4/21,5	8,9/17,0	5,8/11,3	7,9/15,2	0,6/1,2
A11	5,7/11,1	5,5/10,7	5,3/10,3	2,6/5,1		15,9/29,3	10,4/19,7
B7	7,4/14,3	11,1/21,0	9,8/18,6	8/15,4	4,4/8,6	9,5/18,1	5/9,8
B8	7,6/14,6	9,4/17,9	10/19,0	3,1/6,1	6/11,6	3,8/7,5	
B18	5,2/10,1	3,7/7,3	4,7/9,2	3,2/6,3	4,5/8,8	2,5/4,9	
B27	3,4/6,7	3,9/7,6	3,9/7,6	1,8/3,6	1,9/3,8	2,8/5,5	0,4/0,8
B35	8,2/15,7	9/17,2	8,6/16,5	8,3/15,9	13,9/25,9	12/22,6	8,1/15,5
C2	5,1/9,9	7,7/14,8	5,4/10,5	10,1/19,2	7,6/14,6	2,5/4,9	12,2/22,9
C4	10,9/20,6	11,8/22,2	9,6/18,3	21,2/37,9	18,1/32,9	14/26,0	4,3/8,4
C7	20,9/37,4	28,6/49,0	21,6/38,5	18,2/33,1	12,5/23,4	11,2/21,1	1,1/2,2

* les molécules HLA I prépondérantes (fréquence génique > 5 %) sont indiquées en gras

Il s'agit également des molécules HLA II comprenant une chaîne bêta codée par un allèle dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, comme précisé au Tableau II ci-dessous.

5

Tableau II : Fréquence génique (allélique*)/phénotypique d'HLA II

Allèles	Europe		USA		Afrique	Asie	
	France	Allemagne	Caucasien	Afro-américain	Sénégal	Inde	Japon
DRB1*0101	9,3/17,7	6,7/13	7,3/14,1	1,9/3,8	0,6/1,2	3,8/7,5	4,9/9,6
DRB1*0401	5,6/10,9	8,1/15,5	6,7/13	1,5/3,0	0/0	0,9/1,8	0/0
DRB1*1101	9,2/17,6	9,2/17,6	4,4/8,6	8,2/15,7	9,3/17,7	0,9/1,8	2/4
DRB1*0701	14,0/26	12,3/23,1	14,4/26,7	9,8/18,6	7,8/15	13/24,3	0,6/1,2
DRB1*0301	10,9/20,6	9,4/17,9	9,5/18,1	7/13,5	10,2/19,4	5,3/10,3	0,4/0,8
DRB1*1301	6,0/11,6	4,5/8,8	5,1/9,9	4,2/8,2	4,7/9,2	6,3/12,2	0,7/1,4
DRB1*1501	8,0/14,4	7,8/15	10,3/19,5	8,6/16,5	0/0	12,1/22,7	9,1/17,4
TOTAL	63,0/86,3	58,0/82,4	57,7/82,1	41,2/65,4	32,1/54,66	42,3/66,7	17,7/32,3
DRB5*0101	7,9/15,2	4,6/9	2,4/4,7	10,4/19,7	0/0	0/0	5,6/10,9
DRB3*0101	9,2/17,6	9,8/18,6	10,4/19,7	15,1/27,9	6,9/13,3	4,9/9,6	6,5/12,6
DRB4*0101	28,0/48,2	21,1/37,7	19,8/35,7	16,5/30,3	6,9/13,3	24,8/43,4	28,9/49,4
TOTAL	45,1/69,9	35,5/58,4	32,6/54,6	42,0/66,4	13,8/25,7	29,7/50,6	41,0/65,2
DPB1*0101	7,1/13,7	2,2/4,4	3,2/6,3	27,7/47,7	18,2/33,1		0,1/0,2
DPB1*0201	11,9/22,4	8,5/16,3	9,8/18,6	12,9/24,1	13,8/25,7		20,6/37
DPB1*0301	17,0/31,1	3,8/7,5	7,4/14,3	3,3/6,5	3,8/7,5		3/5,9
DPB1*0401	40,0/64	38,1/61,7	25,1/43,9	11/20,8	4,8/9,4		4,7/9,2
DPB1*0402	11,0/20,8	15,4/28,4	12,6/23,6	9/17,2	25,5/44,5		36,8/60,1
TOTAL	87,0/98,3	68,0/89,8	58,1/82,4	63,9/87,0	66,1/88,5		65,2/87,9
DP401+402	51/76	53,5/78,4	37,7/61,2	20/36,0	30,3/51,4		41,5/65,8

* les molécules HLA II prépondérantes (fréquence génique > 5 %) sont indiquées en gras

Certaines des molécules HLA prépondérantes dans la population caucasienne et notamment les molécules HLA-DP401 et HLA-DP402 sont également prépondérantes dans d'autres populations (Amérique du Sud, Inde, Japon, Afrique ; Tableau II). En conséquence, les peptides selon l'invention ne sont pas restreints à une utilisation dans la population caucasienne, et ils peuvent également être utilisés pour vacciner des individus de pays autres que ceux d'Amérique du Nord et d'Europe, dans lesquels lesdites molécules HLA sont prépondérantes, comme précisé au Tableau II.

- Au sens de la présente invention les termes « prévalent », « prédominant » et « prépondérant » sont considérés comme équivalents et utilisés indifféremment.

- On entend par "épitope T CD4+ de la Midkine restreint aux molécules HLA II prépondérantes dans la population caucasienne", un peptide de 11 à 15 acides aminés qui lie au moins une molécule HLA II, prépondérante dans la population caucasienne et est reconnu par des lymphocytes T CD4⁺ chez les individus de cette population ; le peptide comprend une séquence de 9 acides aminés incluant les résidus d'ancrage aux molécules HLA II, flanquée à l'une de ses extrémités, de préférence aux deux extrémités, par au moins 2 acides aminés, de préférence 3 acides aminés.

- On entend par "épitope T CD8+ de la Midkine restreint aux molécules HLA I prépondérantes dans la population caucasienne", un peptide de 8 à 13 acides aminés qui lie au moins une molécule HLA I prépondérante dans la population caucasienne et est reconnu par des lymphocytes T CD8⁺ chez les individus de cette population; le peptide comprend une séquence de 8 à 9 acides aminés incluant les résidus d'ancrage aux molécules HLA I.

- On entend par « cancer », un cancer associé à la surexpression de la protéine Midkine par des cellules tumorales tel que de façon non-limitative : les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du colon, du pancréas, de la thyroïde, des poumons, du sein, de la vessie, de l'utérus, de l'ovaire, de la prostate, les carcinomes hépatocellulaires, les ostéosarcomes, les neuroblastomes, les glioblastomes, les astrocytomes, les leucémies et les tumeurs de Wilm.

- On entend par acide aminé naturel ou synthétique, les 20 α -acides aminés naturels communément trouvés dans les protéines (A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y et V), certains acides aminés rarement rencontrés dans les protéines (hydroxyproline, hydroxylysine, méthyllysine, diméthyllysine..), les acides aminés qui n'existent pas dans les protéines tels que la β -alanine, l'acide γ -aminobutyrique, l'homocystéine, l'ornithine, la citrulline, la canavanine, la norleucine, la cyclohexylalanine..., les acides aminés D dérivés des acides aminés L et les analogues des acides aminés précédents.

- On entend par acide aminé hydrophobe, un acide aminé sélectionné parmi (code à une lettre) : A, V, L, I, P, W, F et M.

- On entend par acide aminé aromatique, un acide aminé sélectionné parmi (code à une lettre) : F, W et Y.

Les peptides selon l'invention sont reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ chez la majorité des individus dans la mesure où ils sont présentés par des molécules HLA I et HLA II qui sont prépondérantes dans la population caucasienne. Ils sont immunogènes c'est à dire qu'ils sont capables d'induire des lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ spécifiques de la Midkine à partir des précurseurs présents chez la majorité des individus naïfs ou bien de stimuler de tels lymphocytes T chez la majorité des individus présentant un cancer associé à la surexpression de la Midkine. En outre, les lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ qui sont induits chez la majorité des individus reconnaissent la Midkine exprimée par les tumeurs de ces individus. L'immunogénicité des peptides peut être déterminée, notamment à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs), par tout essai approprié connu de l'Homme du métier comme par exemple : un test de prolifération cellulaire, un test de cytotoxicité, un test ELISPOT (dosage des cellules productrices de cytokines) ou un test de dosage des cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, TNF- α et TGF- β).

L'invention englobe les peptides variants naturels ou synthétiques obtenus par mutation (insertion, délétion, substitution) d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence de la Midkine, dès lors que ledit peptide conserve une bonne affinité pour les molécules HLA prépondérantes et est immunogène. Les variants naturels résultent notamment du polymorphisme de la Midkine. En outre, d'autres variants peuvent être aisément construits étant donné que les résidus d'acides aminés

impliqués dans la liaison aux molécules HLA- DR et HLA-DP4 (résidus d'ancrage) et l'effet des modifications de ces résidus sur la liaison aux molécules HLA-DR et HLA-DP4 sont connus de l'Homme du métier ; la Demande Internationale PCT WO 03/040299 enseigne notamment que pour lier HLA-DP4, le résidu en P6 doit être

5 aromatique ou hydrophobe ou consister en un résidu de cystéine (C), et au moins l'un des résidus P1, P9 est tel que P1 est aromatique ou hydrophobe et/ou P9 est aromatique ou hydrophobe ou consiste en un résidu C, D, Q, S, T ou E, alors que le résidu en P4 peut être n'importe quel résidu d'acide aminé. Le Brevet américain US 6,649,166 décrit une méthode générale permettant de déterminer les résidus d'ancrage

10 aux molécules HLA DR (P1, P4, P6, P7 et P9) et la nature des mutations de ces résidus permettant de modifier l'affinité pour les molécules HLA DR. Des motifs de liaison aux molécules HLA DR sont décrits notamment dans Sturnolio *et al.*, Nat. Biotech, 1999, 17, 533-534 et Rammensee *et al.*, Immunogenetics, 1995, 41, 178-228.

Les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison aux molécules

15 HLA-I (résidus d'ancrage) et l'effet des modifications de ces résidus sur la liaison aux molécules HLA-I sont connus de l'Homme du métier. Les motifs de liaison des peptides aux molécules HLA de classe I sont décrits dans Rammensee *et al.*, Immunogenetics, 1995, 41, 178-228 et dans le Tableau III ci-dessous.

Tableau III : Motifs de liaison des principaux allèles HLA-A*

Allèles	positions								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A1		T, S	D,E				L		Y
A2		L,M				V			V,L
A3		L,V,M	F,Y			I,M,F,V,L	I,M,L,F		K,Y,F
A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y,I				L,I,Y,F,V		K,R

20 * les résidus majeurs d'ancrage sont en gras.

Il est également connu que certaines substitutions améliorent l'affinité des peptides pour les molécules HLA I sans perturber leur antigénicité c'est le cas de l'introduction d'une tyrosine en position 1 sur un peptide se liant à HLA-A2 (Tourdot et al., Eur. J. Immunol., 2000, 30, 3411-3421).

25 L'invention englobe également les peptides modifiés dérivés des précédents par introduction de toute modification au niveau de résidu(s) d'acide aminé, de la liaison peptidique ou des extrémités des peptides, dès lors que ledit peptide modifié conserve une bonne affinité les molécules HLA prépondérantes et est

immunogène. Ces modifications qui sont introduites dans les peptides par les méthodes classiques connues de l'Homme du métier, incluent de façon non-limitative : la substitution d'un acide aminé par un acide aminé non-protéinogénique (acide aminé D ou analogue d'acide aminé) ; l'addition de groupement chimique (lipide, oligo ou polysaccharide) au niveau d'une fonction réactive, notamment de la chaîne latérale R ; la modification de la liaison peptidique (-CO-NH-), notamment par une liaison du type rétro ou rétro-inverso (-NH-CO-) ou une liaison différente de la liaison peptidique ; la cyclisation ; la fusion d'un peptide (épitope d'intérêt pour la vaccination ; étiquette utile pour la purification du peptide, notamment sous forme clivable par une protéase) ; la fusion de la séquence dudit peptide avec celle d'une protéine, notamment une chaîne α d'une molécule HLA I ou HLA II, une chaîne β d'une molécule HLA II ou le domaine extracellulaire de ladite chaîne ou bien encore une séquence de ciblage dans l'endosome dérivée notamment de la chaîne invariable Ii ou de la protéine LAMP-1 ; le couplage à une molécule appropriée, notamment un marqueur, par exemple un fluorochrome ou la biotine. Ces modifications sont destinées en particulier à augmenter la stabilité et plus particulièrement la résistance à la protéolyse, ainsi que la solubilité, l'immunogénicité ou à faciliter la purification ou la détection, soit du peptide selon l'invention, soit de cellules CD4⁺ et/ou CD8⁺ spécifiques dudit peptide.

20 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit peptide est constitué par la protéine Midkine. De préférence, il s'agit de la protéine humaine de séquence SEQ ID NO : 2.

25 La présente invention englobe l'utilisation de la protéine Midkine dénaturée par tout moyen approprié connu de l'Homme du métier, et notamment la protéine Midkine réduite.

La présente invention englobe également l'utilisation de variants de la protéine Midkine dans lesquels l'une au moins des cystéines impliquées dans un pont disulfure est remplacée par un autre acide aminé, par exemple une sérine.

30 La présente invention englobe également l'utilisation de peptides d'au moins 8 acides aminés issus de la protéine Midkine qui comprennent au moins un épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ tel que définis ci-dessus. L'invention englobe l'utilisation de peptides qui lient l'une des molécules HLA I et/ou l'une des molécules HLA II les

plus fréquentes dans la population caucasienne, notamment la molécule HLA-A2 (Tableau I) et/ou les molécules HLA-DR7, HLA-DRB4, HLA-DP401 ou HLA-DP402 (Tableau II). L'invention englobe également l'utilisation de peptides qui lient plusieurs molécules HLA I et/ou HLA II prépondérantes différentes, de façon à élargir la couverture vaccinale à la majorité de la population caucasienne.

L'invention englobe également l'utilisation de peptides d'au moins 8 acides aminés du domaine N-terminal de la Midkine (positions 1 à 84 en référence à la séquence du précurseur de la Midkine) qui comprennent au moins un épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ tel que définis ci-dessus.

Conformément à l'invention, ledit fragment présente une longueur de 8 à 100 acides aminés, de préférence de 8 à 50 acides aminés, de manière préférée de 10 à 25 acides aminés (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 acides aminés).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit peptide est un fragment d'au moins 8 acides aminés de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD8⁺ restreint à la molécule HLA-A2, lequel peptide comprend au moins les positions 14 à 21 ou 114 à 122 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine.

De préférence, ledit peptide comprend les positions 12 à 21, 13 à 21, 13 à 22, 14 à 22 ou 113 à 122 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine.

De manière préférée, ledit peptide est constitué par les positions 12 à 21 (MDK 12-21), 13 à 21 (MDK 13-21), 13 à 22 (MDK 13-22), 14 à 22 (MDK 14-22), 113 à 122 (MDK 113-122) ou 114 à 122 (MDK 114-122) de la séquence en acides aminés de la protéine Midkine ; ces peptides correspondent, respectivement aux séquences SEQ ID NO : 3 à 8 dans le listage des séquences en annexe.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit peptide est un fragment d'au moins 8 acides aminés de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD4⁺ restreint à au moins une molécule HLA II prépondérante dans la population caucasienne, lequel peptide comprend au moins les positions 9 à 15, 14 à 28, 52 à 64, 64 à 78, 70 à 84, 74 à 88, 78 à 92, 84 à 98, 99 à 113, 105 à 119, 110 à 124 ou 119 à 133 de la séquence en acides aminés de ladite protéine

Midkine. Des exemples de ces peptides sont les peptides de séquence SEQ ID NO : 9, 10, 13 à 15, 21 à 26, 28, 29 et 30 (Tableau VII).

De préférence, ladite molécule HLA II prépondérante dans la population caucasienne est choisie parmi les molécules HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13, HLA-DR15, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DP401 et HLA-DP402. Lesdites molécules HLA II sont avantageusement codées respectivement par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501, DRB3*0101, DRB4*0104, DRB5*0101, DP*0401 et DP*0402.

De préférence, ledit peptide lie au moins quatre molécules HLA II différentes, prépondérantes dans la population caucasienne et comprend au moins les positions 9 à 15, 14 à 28 ou 110 à 124 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine. Ledit peptide comprend avantageusement les positions 1 à 15, 4 à 18, 9 à 21, 9 à 22, 9 à 23 ou 14 à 28 de la séquence en acides aminés de la protéine Midkine.

De manière préférée, ledit peptide est constitué par les positions 1 à 15 (MDK 1-15), 4 à 18 (MDK 4-18), 9 à 21 (MDK 9-21), 9 à 22 (MDK 9-22), 9 à 23 (MDK 9-23), 14 à 28 (MDK 14-28), ou 110 à 124 (MDK 110-124) de la séquence en acides aminés de la protéine Midkine ; ces peptides correspondent, respectivement aux séquences SEQ ID NO : 9 à 15 dans le listage des séquences en annexe.

Conformément à l'invention, ledit peptide comprend avantageusement plusieurs épitopes T CD4⁺ et/ou CD8⁺ de la protéine Midkine, éventuellement associés à d'autres épitopes T CD4⁺, TCD8⁺ ou B. Les épitopes sont avantageusement des épitopes T CD4⁺ ou T CD8⁺ issus d'antigène tumoraux tels que décrits sur le site <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/tumorspecific.htm>, notamment des épitopes T CD4⁺ ou T CD8⁺ issus de MAGE, NY-ESO-1 ou de la survivine.

Selon une disposition avantageuse, des modes de réalisation précédents ledit peptide est un fragment de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD8⁺ restreint à la molécule HLA-A2 et au moins un épitope T CD4⁺ restreint à au moins quatre molécules HLA II différentes prépondérantes dans la population caucasienne, lequel peptide comprend les positions 9 à 21, 9 à 22, 9 à 23 ou 110 à 124 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine. De préfé-

rence, ledit peptide est constitué par les positions 9 à 21 (MDK 9-21), 9 à 22 (MDK 9-22), 9 à 23 (MDK 9-23) ou 110 à 124 (MDK 110-124) de la séquence en acides aminés de la protéine Midkine.

Un tel peptide permet avantageusement d'induire à la fois des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques de nombreuses tumeurs chez la majorité des individus de la population caucasienne présentant ces tumeurs.

Les différents épitopes peuvent être inclus dans la composition vaccinale sous la forme d'un mélange de peptides isolés, d'un peptide multiépitopique, d'une protéine de fusion ou d'un polynucléotide codant les peptides/protéine précédents. Lesdits peptides/protéine peuvent être modifiés ou associés à des liposomes ou des lipides, en particulier sous forme de lipopeptides. De préférence, ledit polynucléotide est inclus dans un vecteur, notamment un vecteur d'expression.

Parmi les épitopes pouvant être incorporés dans la composition vaccinale de l'invention, on peut citer notamment :

- les épitopes T CD8⁺ de MAGE tels que décrits dans le Brevet US 6,063,900 et la Demande PCT WO 2004/052917,
- les épitopes T CD4⁺ de MAGE tels que MAGE-A3 267-282 restreint à DR1 (Demande Internationale PCT WO 02/095051) ; MAGE-A3 149-160 restreint à DR4 et DR7 (Kobayashi *et al.*, Cancer Research, 2001, 61, 4773-4778) ; MAGE-A3 191-205 et 281-295 restreints à DR11 (Consogno *et al.*, Blood, 2003, 101, 1038-1044 ; Manici *et al.*, J. Exp. Med., 1999, 189, 871-876) et MAGE-A3 121-134 restreint à DR13 (Brevet US 6,716,809) ; MAGE-A1 281-292 restreint à DR15 (Demande Internationale PCT WO 00/78806) ; MAGE-A6 102-116, 121-144, 140-170, 145-160, 150-165 et 246-263 restreints à DR4 (Tatsumi *et al.*, Clinical Cancer Research, 2003, 9, 947-954) MAGE-A1 281-292 restreint à DR15 (Demande Internationale PCT WO 00/78806) ; MAGE-A6 102-116, 121-144, 140-170, 145-160, 150-165 et 246-263 restreints à DR4 (Tatsumi *et al.*, Clinical Cancer Research, 2003, 9, 947-954) et les épitopes MAGE restreints à HLA-DP4 tels que décrits dans la Demande Internationale PCT WO 2007/026078,
- un épitope T CD8⁺ de la survivine choisi parmi : survivine 96-104 (LTLGFLK, SEQ ID NO : 39) ou 95-104 (ELTLGFLK, SEQ ID NO : 40),

survivine-2B 80-88 (AYACNTSTL, SEQ ID NO : 41) et les peptides tels que décrits dans le Tableau I de Bachinsky *et al.*, Cancer Immun., 2005, 5, 6-

5 - un épitope T CD4⁺ de la survivine tel que décrit dans la Demande Internationale PCT WO 2007/036638 et notamment le peptide 19-33, 90-104 ou 93-107,

10 - un épitope T CD4⁺ universel naturel ou synthétique tel que le peptide de la toxine tétanique TT 830-846 (O'SULLIVAN *et al.*, J. Immunol., 1991, 147, 2663-2669), le peptide de l'hémagglutinine du virus de la grippe HA 307-319 (O'Sullivan *et al.*, précité), le peptide PADRE (KXVAAWTLKAA, SEQ ID NO : 16; Alexander *et al.*, Immunity, 1994, 1, 751-761) et des peptides issus des antigènes de *Plasmodium falciparum* tels que le peptide CS.T3 (Sinigaglia *et al.*, Nature, 1988, 336, 778-780) et les peptides CSP, SSP2, LSA-1 et EXP-1 (Doolan *et al.*, J. Immunol., 2000, 165, 1123-1137),

15 - un épitope B constitué par un sucre (Alexander *et al.*, précité), ledit épitope B étant de préférence sous la forme d'un glycopeptide, et

- un épitope B de la Midkine reconnu spécifiquement par des anticorps dirigés contre ledit antigène tumoral.

20 La combinaison d'épitope(s) T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ de la Midkine avec l'un au moins des épitopes tels que définis ci-dessus permet avantageusement d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale et notamment l'établissement d'une mémoire immunitaire de long terme.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit peptide issu de la Midkine est un peptide multi-épitopique comprenant la concaténation d'au moins deux épitopes identiques ou différents dont l'un au moins est un épitope T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ de la Midkine. Le peptide multi-épitopique comprend avantageusement d'autres épitopes (épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ d'un autre antigène tumoral), tels que définis ci-dessus. Conformément à l'invention, les séquences des différents épitopes, sont reliées entre elles par une liaison peptidique ou séparées par des séquences hétérologues, c'est-à-dire des séquences différentes de celles naturellement présentes à cette position dans la séquence en acides aminés de la Midkine. De préférence, ledit peptide multiépitopique présente une longueur de 20 à 1000 acides aminés, de manière préférée de 20 à 100 acides aminés.

30

Ledit peptide multiépitopique comprend avantageusement une étiquette fusionnée à l'une de ses extrémités, pour la purification ou la détection dudit fragment. L'étiquette, notamment une séquence polyhistidine ou un épitope B d'un antigène, est de préférence séparée de la séquence multiépitopique par un site de clivage d'une protéase de façon à isoler la séquence multiépitopique, à partir de la fusion.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit peptide issu de la Midkine est un lipopeptide comprenant un peptide ou un fragment multiépitopique, tels que définis ci-dessus.

Ledit lipopeptide est notamment obtenu par addition d'un lipide sur une fonction α -aminée ou sur une fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé dudit peptide ou fragment multiépitopique ; il peut comprendre une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras en C₄₋₂₀, éventuellement ramifiées ou insaturées (acide palmitique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique, acide 2-amino hexadécanoïque, pimélaute, trimétauxide) ou un dérivé d'un stéroïde. La partie lipidique préférée est notamment représentée par un groupe N ^{α} -acétyl-lysine N ^{ϵ} (palmitoyl), également dénommé Ac-K(Pam).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit peptide issu de la Midkine est fusionné avec une protéine ou un fragment de protéine hétérologue (protéine de fusion).

Le peptide ou le fragment multiépitopique peuvent être fusionnés avec l'extrémité NH₂ ou COOH de ladite protéine ou insérés dans la séquence de ladite protéine. Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine de fusion, elle est constituée par un peptide tel que défini ci-dessus, fusionné avec une séquence de ciblage dans l'endosome, dérivée de préférence d'une chaîne invariable humaine Ii ou de la protéine LAMP-1. Les séquences de ciblage dans l'endosome et leur utilisation pour le ciblage d'antigènes dans l'endosome sont notamment décrites dans Sanderson *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 7217-7222), Wu *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 11671-11675) et Thompson *et al.* (J. Virol., 1998, 72, 2246-2252).

Selon une disposition avantageuse de ladite protéine de fusion, elle est constituée par un peptide tel que défini ci-dessus, fusionné avec l'une des chaînes

d'une molécule HLA, de préférence la chaîne bêta d'une molécule HLA II ou la chaîne alpha d'une molécule HLA I, ou bien avec un fragment de celle-ci correspondant à une molécule HLA soluble, notamment un fragment correspondant au domaine extracellulaire précédé du peptide signal homologue ou d'un peptide signal hétéro-
5 logue. Ledit peptide est avantageusement inséré entre le peptide signal et l'extrémité NH₂ du domaine extracellulaire de la chaîne α ou β , comme décrit pour la molécule HLA-DR (Kolzin *et al.*, PNAS, 2000, 97, 291-296).

Alternativement, ledit peptide ou ledit fragment multiépitopique sont fusionnés avec une protéine facilitant leur purification ou leur détection, connue de
10 l'Homme du métier comme notamment la Glutathione-S- Transférase (GST) et les protéines fluorescentes (GFP et dérivées). Dans ce cas, la séquence du peptide ou du fragment multiépitopique d'intérêt est de préférence séparée du reste de la protéine par un site de clivage d'une protéase, pour faciliter la purification dudit peptide ou dudit fragment multiépitopique.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit polynucléotide code pour un peptide, un fragment multiépitopique ou une protéine de fusion tels que définis ci-dessus.

Conformément à l'invention, la séquence dudit polynucléotide est celle de l'ADNc codant pour ledit peptide ou fragment multiépitopique ou ladite
20 protéine de fusion. Ladite séquence peut avantageusement être modifiée de façon à ce que l'usage des codons soit optimal chez l'hôte dans lequel elle est exprimée. En outre, ledit polynucléotide peut être lié à au moins une séquence hétérologue.

Au sens de la présente invention, on entend par séquence hétérologue relativement à une séquence d'acide nucléique codant pour la Midkine, toute
25 séquence d'acide nucléique autre que celles qui, dans la nature, sont immédiatement adjacentes à ladite séquence d'acide nucléique codant ledit peptide de la Midkine.

De préférence, ledit polynucléotide est inséré dans un vecteur.

Au sens de la présente invention, on entend par vecteur une molécule d'acide nucléique capable de transporter un autre acide nucléique à laquelle elle
30 est associée. Un type de vecteur qui peut être utilisé dans la présente invention inclut, de façon non-limitative, une molécule d'ADN ou d'ARN linéaire ou circulaire constituée d'acides nucléiques chromosomiques, non-chromosomiques, synthétiques

ou semi-synthétiques, tel que notamment un vecteur viral, un plasmide ou un vecteur à ARN.

De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de cette séquence sous forme extrachromosomique, ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte. Par exemple, on peut utiliser des acides nucléiques nus (ADN ou ARN) ou des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt ; on peut également associer ladite séquence (isolée ou insérée dans un vecteur plasmidique) avec une substance lui permettant de franchir la membrane des cellules hôtes, telle qu'un transporteur comme un nanotransporteur ou une préparation de liposomes, ou de polymères cationiques, ou bien l'introduire dans ladite cellule hôte en utilisant des méthodes physiques telles que l'électroporation ou la microinjection. En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation associée à des liposomes.

De préférence, ledit vecteur comprend tous les éléments nécessaires à l'expression du peptide ou de la protéine tels que définis ci-dessus. Par exemple, ledit vecteur comprend une cassette d'expression incluant au moins un polynucléotide tel que défini ci-dessus, sous le contrôle de séquences régulatrices de la transcription et éventuellement de la traduction appropriées (promoteur, activateur, intron, codon d'initiation (ATG), codon stop, signal de polyadénylation, site d'épissage).

La composition vaccinale selon l'invention comprend avantageusement un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une substance porteuse et/ou un adjuvant.

Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

Les adjuvants sont avantageusement choisis dans le groupe constitué par : les émulsions huileuses, les substances minérales, les extraits bactériens, les

oligonucléotides contenant des CpG, la saponine, l'hydroxyde d'alumine, le monophosphoryl -lipide A et le squalène.

Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par : les liposomes unilamellaires ou multilamellaires, les ISCOMS, les virosomes, les pseudoparticules virales, les micelles de saponine, les microsphères solides de nature saccharidique (poly(lactide-co-glycolide)) ou aurifère, et les nanoparticules.

La composition vaccinale comprend une dose efficace de peptide/protéine/lipopeptide/vecteur permettant d'obtenir un effet prophylactique/thérapeutique sur le cancer associé à une surexpression tumorale de la Midkine tel que défini ci-dessus. Cette dose est déterminée et ajustée en fonction de facteurs tels que l'âge, le sexe et le poids du sujet. La composition vaccinale est généralement administrée selon les protocoles usuels de vaccination, à des doses et pendant une durée suffisante pour induire une réponse cellulaire dirigée contre la protéine Midkine. L'administration peut être sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intradermique, intrapéritonéale, orale, sublinguale, rectale, vaginale, intranasale, par inhalation ou par application transdermique.

La composition se présente sous une forme galénique adaptée à une administration choisie : solution stérile injectable, poudre, comprimés, gélules, suspension, sirop, suppositoires, qui sont préparés selon les protocoles standard.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend au moins un épitope T CD4+ et un épitope T CD8+ de la Midkine, sous forme d'un mélange de peptides, d'un fragment multiépitopique et/ou d'un vecteur d'expression codant lesdits peptides ou ledit fragment, tels que définis ci-dessus.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation de ladite composition, elle comprend au moins le peptide MDK 9-21, MDK 9-22, MDK 9-23 ou MDK 110-124.

De préférence, le peptide MDK 9-21, MDK 9-22 ou MDK 9-23 est combiné au peptide MDK 74-88 ou 78-92, au peptide MDK 14-28 ou 99-113 et au peptide MDK 4-18.

Une telle combinaison de peptides qui lie la molécule HLA-A2 et l'ensemble des molécules HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11,

HLA-DR13, HLA-DR15, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DP401 et HLA-DP402 (Tableau VII) , permet avantageusement d'induire des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ chez la quasi-totalité des individus vaccinés.

5 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend un peptide incluant un épitope T CD4+ universel et/ou un épitope T CD4+ et/ou T CD8+ d'un autre antigène tumoral, tel que défini ci-dessus.

Les peptides selon la présente invention et les produits dérivés (peptide multiépitopique, protéine de fusion, lipopeptide, vecteur recombinant) peuvent être utilisés en immunothérapie dans le traitement des tumeurs surexprimant
10 la Midkine. Lesdits peptides ou produits dérivés sont utilisés, soit comme vaccin, soit en thérapie cellulaire, ou bien encore par une combinaison des deux approches.

La thérapie cellulaire comprend, la préparation de cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques) par un protocole classique comprenant l'isolement de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) d'un patient à
15 traiter et la mise en culture des cellules dendritiques en présence de peptide(s). Dans une seconde étape les cellules présentatrices d'antigène chargées avec le peptide sont réinjectées au patient.

La présente invention a également pour objet une composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment peptidique issu de la
20 Midkine tel que défini ci-dessus, un peptide multiépitopique, une protéine de fusion, un lipopeptide ou un vecteur tels que définis ci-dessus, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une substance porteuse ou un adjuvant.

La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination antitumorale, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle
25 comprend l'administration d'une composition vaccinale telle que définie ci-dessus, à un individu, par tout moyen approprié tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un peptide tel que défini ci-dessus pour la préparation d'un réactif d'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine, destiné à l'évaluation du pronostic ou
30 au suivi du traitement d'un cancer (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie). De préférence, ledit réactif comprend un peptide ou une protéine de fusion tels que définis ci-dessus, par exemple marqué et/ou complexé à une molécule HLA,

sous la forme de complexes multimériques HLA/peptide comme des tétramères de complexes HLA/peptide, marqués.

La présente invention a également pour objet une méthode *in vitro*, d'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine chez un individu
5 présentant un cancer, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un échantillon biologique dudit individu avec un peptide tel que défini ci-dessus, et

- la détection de lymphocytes T CD4+ et/ou T CD8+ spécifiques de la Midkine, par tout moyen approprié.

10 La méthode selon l'invention permet de suivre l'évolution de la réponse T CD4+ et/ou T CD8+ dirigée contre la Midkine au cours d'un cancer ou bien d'un traitement antitumoral, notamment une immunothérapie antitumorale ; les lymphocytes T CD4+ spécifiques de la Midkine peuvent être de type TH1 (sécrétion d'IFN- γ), TH2 (sécrétion d'IL-4) ou T régulateur (sécrétion d'IL-10 ou de TGF- β) ; il
15 est attendu que la réponse T de type TH1 est signe d'une évolution favorable du cancer alors que la réponse T régulatrice est signe d'une évolution défavorable de ce cancer. La détection est effectuée à partir d'un échantillon biologique contenant des cellules T CD4+ et/ou T CD8+, notamment un échantillon de cellules mononucléées isolées à partir d'un prélèvement de sang périphérique (PBMCs).

20 Les lymphocytes T CD4+ et/ou T CD8+ spécifiques de la Midkine sont détectés par tous moyens, connus en eux-mêmes. Par exemple, on peut utiliser des moyens directs comme la cytométrie de flux en présence de complexes multi-
25 mériques tels que définis ci-dessus, ou bien des moyens indirects comme les tests de prolifération lymphocytaire, les tests de cytotoxicité cellulaire et les dosages de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, IL-10 et l'IFN- γ , notamment par des techniques immunoenzymatiques (ELISA, RIA, ELISPOT) ou par cytométrie de flux (dosage des cytokines intracellulaires).

De manière plus précise :

30 Une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD4+ ou CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides tels que définis ci-dessus ou des lymphocytes T clonés) est mise en présence desdits peptides et au besoin de cellules présentatrices appropriées,

telles que des cellules dendritiques, des PBMC autologues ou hétérologues, des cellules lymphoblastoïdes telles que celles obtenues après infection par le virus EBV ou des cellules génétiquement modifiées. La présence de cellules T CD4+ et/ou T CD8+ spécifiques de la Midkine, dans la suspension initiale est détectée à l'aide des peptides, selon l'une des méthodes suivantes :

5 * test de prolifération :

La prolifération des cellules T CD4+ et/ou T CD8+ spécifiques de la Midkine est mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules.

* test ELISPOT :

10 Le test ELISPOT permet de révéler la présence de cellules T sécrétant de cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α et TGF- β) spécifiques d'un peptide tel que défini ci-dessus. Le principe de ce test est décrit dans Czerkinsky *et al.*, J. Immunol. Methods, 1983, 65, 109-121 et Schmittel *et al.*, J. Immunol. Methods, 1997, 210, 167-174, et sa mise en œuvre est illustrée dans la Demande Internationale
15 WO 99/51630 ou Gahéry-Ségard *et al.*, J. Virol., 2000, 74, 1694-1703.

* détection des cytokines :

La présence de cellules T spécifiques de la Midkine, sécrétant des cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α et TGF- β) est détectée, soit par dosage des cytokines présentes dans le surnageant de culture, par un test immuno-
20 enzymatique, notamment à l'aide d'un kit commercial, soit par détection des cytokines intracellulaires en cytométrie de flux. Le principe de détection des cytokines intracellulaires est décrit dans Goulder *et al.*, J. Exp. Med., 2000, 192, 1819-1832 et Maecker *et al.*, J. Immunol. Methods, 2001, 255, 27-40 et sa mise en œuvre est illustrée dans Draenert *et al.*, J. Immunol. Methods, 2003, 275, 19-29.

25 * complexes multimériques

- un échantillon biologique, de préférence des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), est mis en contact avec des complexes multimériques marqués, notamment par un fluorochrome, formés par la liaison entre des molécules HLA solubles et des peptides tels que définis ci-dessus, et

30 - les cellules marquées par lesdits complexes multimériques sont analysées, notamment par cytométrie de flux.

De manière avantageuse, préalablement à la mise en contact de l'échantillon biologique avec lesdits complexes, on l'enrichit en cellules T CD4+ et/ou T CD8+, en le mettant en contact avec des anticorps anti-CD4 ou anti-CD8.

Les complexes multimériques HLA /peptide peuvent être préparés à partir de molécules natives extraites de cellules exprimant une molécule HLA I et ou HLA II ou de molécules recombinantes produites dans des cellules hôte appropriées comme précisé, par exemple dans NOVAK *et al.* (J. Clin. Investig., 1999, 104, R63-R67) ou dans KURODA *et al.* (J. Virol., 2000, 74, 18, 8751-8756). Ces molécules HLA peuvent notamment être tronquées (délétion du domaine transmembranaire) et leur séquence peut-être modifiée afin de les rendre solubles ou bien de faciliter l'appariement des chaînes alpha et bêta (Novak *et al.*, précité).

Le chargement de molécules HLA avec le peptide peut se faire par mise en contact d'une préparation de molécules HLA comme ci-dessus, avec le peptide. Par exemple, des molécules HLA solubles et biotinylées sont incubées, pendant 72 heures à 37°C, avec un excès d'un facteur 10 de peptides tels que définis ci-dessus, dans un tampon phosphate-citrate 10 mM, NaCl 0,15 M à un pH compris entre 4,5 et 7.

Alternativement, la séquence du peptide peut être introduite dans l'une des chaînes de la molécule HLA sous forme d'une protéine de fusion qui permet la préparation de complexes multimériques HLA /peptides à partir de cellules hôtes appropriées exprimant ladite protéine de fusion. Lesdits complexes peuvent ensuite être marqués, notamment par la biotine.

Les complexes multimériques de type tétramère sont notamment obtenus en ajoutant aux molécules HLA chargées, de la streptavidine marquée par un fluorochrome en quantité quatre fois moindre (mole à mole) par rapport aux molécules HLA. L'ensemble étant ensuite incubé pendant une durée suffisante, par exemple une nuit à température ambiante.

Les complexes multimériques peuvent également être formés, soit par incubation de monomères HLA /peptides avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine comme décrit pour les molécules HLA I (Bodinier *et al.*, Nature, 2000, 6, 707-710), soit par insertion de monomères HLA /peptides dans des vésicules

lipidiques comme décrit pour les molécules du CMH de classe II murines (Prakken, Nature Medicine, 2000,6, 1406-1410).

Pour utiliser ces complexes multimériques HLA /peptide notamment de type tétramère, on met en contact une suspension de cellules (PBMC, PBMC
5 déplétées en cellules CD4+ et/ou CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec des peptides tels que définis ci-dessus ou des lymphocytes T clonés) avec des complexes multimériques HLA /peptide à une concentration appropriée (par exemple de l'ordre de 10 à 20 µg/ml), pendant une
10 durée suffisante pour permettre la liaison entre les complexes et les lymphocytes T CD4+ et/ou CD8+ spécifiques de la Midkine (par exemple, de l'ordre de 1 à 3 heures). Après lavage, la suspension est analysée par cytométrie de flux : on visualise le marquage des cellules par les complexes multimériques qui sont fluorescents. La cytométrie de flux permet de séparer les cellules marquées par les complexes multi-
mériques HLA/peptide des cellules non marquées et d'effectuer ainsi un tri cellulaire.

15 La présente invention a également pour objet un réactif d'immunomonitoring comprenant au moins un peptide tel que défini ci-dessus. De préférence, ledit réactif est inclus dans un coffret (kit). Ledit réactif d'immunomonitoring comprend avantageusement un peptide ou une protéine de fusion tels que définis ci-dessus, éventuellement marqués ou complexés, notamment
20 complexés à des molécules HLA marquées, par exemple biotinylées, sous la forme de complexes multimériques HLA/peptide comme des tétramères de complexes HLA/peptide, marqués.

La présente invention a ainsi, en outre, pour objet un procédé d'analyse de lymphocytes T CD4+ et/ou T CD8+ spécifiques de la Midkine, caracté-
25 risé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- la mise en contact, *in vitro*, d'un échantillon cellulaire avec des complexes multimériques HLA /peptide marqués, notamment par un fluorochrome, lesdits complexes étant formés par la liaison de molécules HLA solubles avec au moins un peptide tel que défini ci-dessus, et
- 30 - l'analyse des cellules liées auxdits complexes HLA /peptide, notamment en cytométrie de flux.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'analyse des cellules (lymphocytes T CD4+ et/ou T CD8+) comprend le tri desdites cellules.

La présente invention a en outre pour objet un fragment peptidique issu de la Midkine, un peptide multiépitopique, une protéine de fusion, un lipopeptide,
5 tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide, une cassette d'expression, un vecteur recombinant, une cellule hôte procaryote ou eucaryote modifiée, dérivés des peptides/protéine précédents.

L'invention englobe en particulier :

10 a) des cassettes d'expression comprenant au moins un polynucléotide tel que défini ci-dessus, sous le contrôle de séquences régulatrices de la transcription et éventuellement de la traduction appropriées (promoteur, activateur, intron, codon d'initiation (ATG), codon stop, signal de polyadénylation), et

b) des vecteurs recombinants comprenant un polynucléotide
15 conforme à l'invention. Avantageusement ces vecteurs sont des vecteurs d'expression comprenant au moins une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

Les polynucléotides, les vecteurs recombinants et les cellules transformées tels que définis ci-dessus, sont utiles notamment pour la production des peptides, fragments multiépitopiques et protéines de fusion selon l'invention.

20 Les polynucléotides selon l'invention sont obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, ils peuvent être obtenus par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR, par criblage de
25 banques d'ADN génomique par hybridation avec une sonde homologue, ou bien par synthèse chimique totale ou partielle. Les vecteurs recombinants sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes.

30 Les peptides et leurs dérivés (variants, peptides modifiés, lipopeptides, fragments multiépitopiques, protéines de fusion) tels que définis ci-dessus, sont préparés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, notam-

ment par synthèse en phase solide ou liquide ou par expression d'un ADN recombinant dans un système cellulaire approprié (eucaryote ou procaryote).

De manière plus précise :

- les peptides et leurs dérivés (variants, peptides multiépitopiques) peuvent être synthétisés en phase solide, selon la technique Fmoc, originellement décrite par Merrifield et al. (J. Am. Chem. Soc., 1964, **85**: 2149-) et purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse,

- les lipopeptides peuvent être notamment préparés selon le procédé décrit dans les Demandes Internationales WO 99/40113 ou WO 99/51630.

- les peptides et dérivés tels que les variants, les fragments multiépitopiques et les protéines de fusion peuvent également être produits à partir des ADNc correspondants, obtenus par tout moyen connu de l'homme du métier ; l'ADNc est cloné dans un vecteur d'expression eucaryote ou procaryote et la protéine ou le fragment produits dans les cellules modifiées par le vecteur recombinant sont purifiés par tout moyen approprié, notamment par chromatographie d'affinité.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'objet de la présente invention, avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente la séquence peptidique de la Midkine humaine (SEQ ID NO : 2). La séquence complète correspond au précurseur. Le peptide signal est indiqué en caractères gras et souligné.

- la figure 2 illustre la spécificité peptidique des lymphocytes T CD8+ induits contre les peptides de la Midkine. Les lignées de lymphocytes T (267.29A, 278.11A, 314.28) ont été obtenues par stimulation de lymphocytes T de trois individus sains exprimant HLA-A2 (267, 278, 314). Après 4 semaines de culture, leur spécificité a été testée par Elispot IFN- γ .

- la figure 3 illustre la restriction à HLA-A2 des lymphocytes T CD8+ spécifiques des peptides de la Midkine. La restriction a été évaluée par Elispot IFN- γ , à l'aide de cellules C1R et C1R-A2 (C1R transfectées par HLA-A2).

- la figure 4 illustre la reconnaissance des cellules transfectées par un plasmide d'expression de la Midkine, par des lymphocytes T CD8+ spécifiques des

peptides de la Midkine. Les cellules C1R-A2 ont été transfectées par un plasmide pcDNA3.1 recombinant contenant la séquence codante de la Midkine (pMDK). L'activation des lymphocytes T CD8⁺ par les cellules C1R-A2 transfectées par pMDK ou non transfectées a été évaluée par Elispot IFN- γ .

5 - la figure 5 illustre l'expression de la Midkine dans les cellules tumorales. L'expression de la Midkine a été évaluée dans les cellules C1R-A2, DLD-1 et Hep G2 par cytométrie de flux, à l'aide d'un anticorps anti-Midkine. Surface grise: contrôle négatif. Aire sous le trait noir: expression naturelle de la Midkine. Surface noire: expression de la Midkine après transfection des cellules par un plasmide d'expression de la Midkine.

10 - la figure 6 illustre la reconnaissance des lignées tumorales par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des peptides de la Midkine. La reconnaissance des tumeurs a été testée par Elispot IFN- γ , à l'aide de cellules HLA-A2⁺ C1R-A2 (MDK⁻), DLD-1 (MDK⁻) et Hep G2 (MDK⁺). Les cellules marquées d'une étoile ont été cultivées en présence d'IFN- γ .

15 - la figure 7 illustre la détection de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la Midkine par marquage avec des tétramères spécifiques. Les lignées de lymphocytes T 314.7 (A et C) et 314.28 (B et D) sont spécifiques respectivement des peptides MDK 114-122 et MDK 13-21. Chaque lignée a été marquée au moyen d'un anticorps anti-CD8 et des tétramères HLA-A2 / MDK114-122 (A et B) et HLA-A2 / MDK13-21 (C et D) et analysée par cytométrie de flux. Le pourcentage de chaque population de cellules est indiqué dans chaque quadrant.

20 - la figure 8 illustre la restriction à HLA II des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du peptide 9-23 de la Midkine. La restriction a été évaluée par Elispot IFN- γ , à l'aide de cellules L transfectées par une molécule HLA II (HLA-DR7, -DR11, -DR15, -DRB5) et chargées par le peptide 9-23.

25 - la figure 9 illustre la mise en évidence de la reconnaissance de lysats de tumeur par la lignée T 331.24 de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du peptide 9-23 de la Midkine. La reconnaissance des tumeurs a été testée par Elispot IFN- γ , à l'aide de cellules HeLa (MDK⁻), HeLa-pMDK (MDK⁺) et Hep G2 (MDK⁺).

30

Exemple 1 : Induction d'une réponse T CD8+ spécifique de peptides de la protéine Midkine

1) Matériels et méthodes

a) Peptides

5 Sept peptides représentant des épitopes T CD8+ potentiels restreints à la molécule HLA-A2, l'allèle HLA de classe I le plus représenté dans la population Caucasienne, ont été sélectionnés à l'aide du programme BIMAS (<http://www-bimas.cit.nih.gov>). Les séquences des peptides sélectionnés sont présentées dans le Tableau IV et la liste de séquences jointe en annexe.

10 **Tableau IV: Liste des peptides sélectionnés**

Peptide	Séquence	SEQ ID NO:
MDK13-21	ALLALTSAV	4
MDK12-21	LALLALTSAV	3
MDK14-22	LLALTSAVA	6
MDK13-22	ALLALTSAVA	5
MDK114-122	AQCQETIRV	8
MDK113-122	NAQCQETIRV	7
MDK 63-72	AQTQRIRCRV	17

Les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et contrôlés par spectrométrie de masse (ES-MS).

15 **b) Obtention de lignées de lymphocytes T CD8+ spécifiques de peptides de la Midkine et restreintes à HLA-A2**

20 Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de sujets sains possédant la molécule HLA-A2 ont été séparées sur un gradient de Ficoll. Les PBMCs ont ensuite été mises en culture dans du milieu AIM V (LIFE TECHNOLOGIES) et incubées pendant une nuit à 37°C, en présence de 5% CO₂/95%
 25 air. Les lymphocytes T CD8+ ont été purifiés à partir des cellules non adhérentes par tri immunomagnétique et congelés. Les cellules adhérentes ont été différenciées en cellules dendritiques immatures par 5 jours de culture dans du milieu AIM V contenant 1000U/ml de GM-CSF et 1000U/ml d'IL-4 puis en cellules dendritiques matures par 2 jours de culture en présence de 1 µg/ml de LPS, 1000 U/ml d'IL-4 et 1000 U/ml de GM-CSF. Les cellules dendritiques matures ont été incubées en présence de

5 µg/ml de beta-2-microglobuline et 10 µg/ml de chacun des peptides du Tableau IV. Après 4 heures, les cellules ont été lavées puis mises en culture dans des plaques en 96 puits, en présence de lymphocyte T CD8 purifiés, dans du milieu IMDM contenant 10 % de sérum humain de groupe AB, de l'IL-6 (1000U/mL) et de l'IL-12 (5 ng/mL).

5 Chaque semaine, la culture a été re-stimulée par des cellules dendritiques matures, autologues et chargées avec le mélange de peptides précité, dans du milieu contenant 20 U/mL d'IL-2 et 10 ng/mL d'IL-7. Après 4 semaines de culture, la spécificité des lignées de cellules T contenues dans chaque puits a été testée par Elispot IFN γ .

10 c) Présentation de la protéine Midkine aux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des peptides de la Midkine

Les lignées de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du peptide ont été cultivées en présence de cellules C1R-A2 transfectées avec un plasmide pcDNA3.1 (IN VITROGEN) recombinant comprenant la séquence codante de la Midkine sous le contrôle du promoteur CMV et du signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine. L'activation des lymphocytes T CD8⁺ par ces cellules C1R-A2 transfectées a été évaluée par ELISPOT comme précisé ci-dessous.

15 d) Reconnaissance de cellules tumorales par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des peptides de la Midkine

Les lignées de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du peptide ont été cultivées en présence de différentes lignées tumorales : DLD-1 (ATCC® # CCL-221) et Hep G2 (ATCC® # HB-8065). L'activation des lymphocytes T CD8⁺ par ces cellules tumorales a été évaluée par ELISPOT comme précisé ci-dessous.

20 e) ELISPOT

Des anticorps anti-IFN- γ (1-D1K, MABTECH) dilués à 2,5 µg/ml dans du tampon PBS ont été adsorbés sur des plaques de nitrocellulose (MILLIPORE) pendant 1 heure à 37°C. Les plaques ont ensuite été lavées avec du PBS puis saturées avec du milieu ISCOVE contenant 10 % de sérum humain du groupe AB (100 µl/puits), pendant 2 h à 37 °C.

Les cellules présentatrices d'antigène sont, soit des cellules de lignée C1R de cellules lymphoblastoïdes B (Hogan *et al.*, J. Immunol., 1988, 141, 2519-), dépourvues de molécules HLA-A et HLA-B, transfectées avec l'ADNc codant pour HLA-A2 (C1R-A2) et chargées avec un seul peptide (10 µg de peptide) ou le mélange

de peptides (10 µg de chaque peptide), soit des cellules C1R-A2 transfectées avec un plasmide d'expression de la Midkine, ou bien encore des cellules tumorales exprimant la Midkine.

5 Pour vérifier la spécificité des lignées vis-à-vis de la molécule HLA-A2, les cellules C1R transfectées avec HLA-A2 (30 000 cellules/puits) et 5000 lymphocytes à tester ont ensuite été ajoutés dans les plaques et incubées 24 h à 37°C, en présence ou en l'absence d'un seul peptide (10 µg de peptide) ou d'un mélange de peptides (10 µg de chaque peptide). Pour les analyses dose-réponse, les peptides sont utilisées à différentes concentration variant de 0,001 à 10 µg/mL.

10 Pour analyser la reconnaissance par les lymphocytes T CD8+ spécifiques de peptides, des cellules exprimant HLA-A2 transfectées par la Midkine, les cellules C1R transfectées avec HLA-A2 et avec un plasmide d'expression de la Midkine (30 000 cellules/puits) et 5000 lymphocytes à tester ont ensuite été ajoutés dans les plaques et incubées 24 h à 37°C.

15 Pour analyser la reconnaissance des cellules tumorales exprimant la Midkine par les lymphocytes T CD8+ spécifiques de peptides, les cellules tumorales (30 000 cellules/puits) et 5000 lymphocytes à tester ont ensuite été ajoutés dans les plaques et incubées 24 h à 37°C.

20 Après trois lavages successifs avec de l'eau, du tampon PBS Tween 0,05%, et du PBS seul, 100 µl d'anticorps secondaire anti-IFN-γ biotinylé (7-B6-1-biotin, MABTECH), dilué à 0,25 µg/ml dans du PBS contenant 1% BSA, a été ajouté dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, les plaques ont été lavées à nouveau puis incubées pendant une heure à température ambiante avec 100 µl/puits d'Extravidin-AKP (E-2636, SIGMA,), diluée au 1/6000. Après
25 lavage des plaques en tampon PBS, 100 µl de substrat NBT/BCIP (B-5655, SIGMA) dilué dans de l'eau (1 tablette dans 10 ml d'eau) ont été distribués dans chaque puits. La révélation immunoenzymatique a été arrêtée après environ 10 minutes, par rinçage extensif des plaques dans l'eau. Après séchage des plaques, les spots colorés ont été comptés à l'aide d'un lecteur automatique (AID). Les lignées sont considérées posi-
30 tives lorsque le nombre de spots est supérieur à trois fois celui obtenu avec le témoin négatif (témoin sans peptides) avec un minimum de 50 spots. Le témoin sans cellules

présentatrices permet de vérifier la spécificité de la réponse pour HLA-A2 (témoin de restriction).

2) Résultats

5 La capacité de la protéine Midkine à induire une réponse immunitaire cellulaire spécifique de cellules tumorales a été évaluée. Pour ce faire, des épitopes T CD8⁺ restreints à la molécule HLA-A2, la molécule HLA I la plus fréquente dans la population Caucasienne, ont tout d'abord été identifiés dans la séquence de la Midkine. Ensuite, la capacité des cellules T CD8⁺ induites par ces épitopes à reconnaître sélectivement une lignée tumorale exprimant la Midkine a été analysée.

10 Les peptides synthétisés ont été testés pour leur capacité à induire une réponse *in vitro* à partir de cellules collectées chez des sujets sains possédant la molécule HLA-A2. Six de ces peptides ont induit des lymphocytes T CD8⁺: MDK 13-21, MDK 13-22, MDK 12-21, MDK 14-22, MDK 113-122 et MDK 114-122. Comme le montre la figure 2, la lignée de lymphocytes T CD8⁺ 267.29A est spécifique des
15 peptides 12-21, 13-21, 13-22. La lignée 278.11A est spécifique des peptides 13-21, 13-22 et 14-22. La lignée 314.28 est spécifique de peptide 114-122 et dans une moindre mesure du peptide 113-122. Les peptides 12-21, 13-21, 13-22, 14-22, 113-122 et 114-122 sont donc immunogènes et induisent des lymphocytes T CD8⁺ chez des donneurs sains HLA-A2⁺.

20 La restriction des lignées de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de peptides par la molécule HLA-A2 est montrée à la figure 3. Seules les cellules HLA-A2 (C1R-A2) peuvent présenter les peptides aux lignées de lymphocytes T spécifiques. Les cellules C1R (HLA-A2⁻) ne les stimulent pas, même en présence des peptides.

25 Afin de vérifier que les cellules présentatrices étaient capables d'apprêter correctement la Midkine, les cellules C1R-A2 ont été transfectées avec un plasmide pcDNA3.1 recombinant comprenant la séquence codante de la Midkine. La figure 4 montre que les lignées de lymphocytes T CD8⁺ 278.11A (spécifique des peptides 13-22 et 14-22), 297.58 (spécifique des peptides 12-21, 13-21 et 14-22) et
30 314.48 (spécifique du peptide 114-122) sont activées par les cellules transfectées et par les cellules C1R-A2 chargées par les peptides mais pas par les cellules non transfectées.

La reconnaissance de lignées tumorale exprimant ou n'exprimant pas la Midkine par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des peptides de Midkine a également été étudiée. La figure 6 montre l'expression ou non de la Midkine par les différentes lignées. Sur la figure 7, on observe que les lignées de lymphocytes T CD8⁺ 267.29A (spécifique des peptides 13-22, 12-22 et 13-21), 278.11A (spécifique des peptides 13-22 et 14-22), et 314.48 (spécifique du peptide 114-122) reconnaissent les cellules Hep G2 qui exprime naturellement la Midkine mais pas les cellules C1R-A2 et DLD-1 qui n'expriment pas la Midkine. La reconnaissance est légèrement meilleure lorsque les cellules Hep G2 sont cultivée en présence d'IFN- γ , du fait de l'augmentation de l'expression des molécules HLA sur les cellules. La lignée 297.58 (spécifique des peptides 12-21, 13-21 et 14-22) reconnaît les cellules Hep G2 uniquement lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IFN- γ .

L'ensemble de ces résultats montrent que la Midkine contient six peptides répartis en deux groupes de peptides chevauchants capables d'induire une activation de lymphocytes T CD8⁺ restreints à HLA-A2 et qui reconnaissent sélectivement des cellules tumorales exprimant la Midkine.

Exemple 2: Détection de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de peptides de la Midkine par marquage avec des tétramères spécifiques

Chaque lignée de lymphocytes (500 000 cellules) obtenue à l'exemple 1 a été marquée pendant 1 heure à l'obscurité et à 4°C, avec 50 μ g/mL de tétramère dans 200 μ L de PBS 2% SVF. Ces tétramères sont des molécules HLA-A2 chargées par le peptide 13-21 ou 114-122, biotinylées et complexées à de la streptavidine marquée à la phycoérythrine, préparées selon la technique précédemment décrite dans NOVAK *et al.* (J. Clin. Investig., 1999, 104, R63-R67) ou dans KURODA *et al.* (J. Virol., 2000, 74, 18, 8751-8756). Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois en PBS puis marquées pendant 30 min à 4°C à l'aide d'un anticorps anti-CD8 FITC (BD BIOSCIENCES). Après un lavage en PBS, les cellules ont été fixées à l'aide de 50 μ L de PBS contenant 1 % de paraformaldehyde (PAF). Les marquages ont été analysés sur un cytomètre de flux FACSCalibur (BD BIOSCIENCES). Les résultats sont présentés à la figure 7.

Exemple 3 : Induction d'une réponse T CD4+ spécifique de peptides de la protéine Midkine

1) Matériels et méthodes

a) Peptides

5 Des peptides de 15 acides aminés (15-mères) couvrant la totalité de la séquence de la Midkine humaine (SWISSPROT P21741, SEQ ID NO : 2 et figure 1) ont été sélectionnés en fonction de la présence de résidus aromatiques ou hydrophobes en position 3 ou 4, pour l'ancrage dans la poche P1 des molécules HLA-DR et HLA-DP4.

10 Les séquences des peptides sélectionnés sont présentées dans le Tableau V et la liste de séquences jointe en annexe.

Les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et contrôlés par spectrométrie de masse (ES-MS).

15 **Tableau V: Peptides sélectionnés (SEQ ID NO: 9, 10, 13-15 et 18-30)**

Peptide	Positions*	Séquence
MDK1	MDK 1-15	M Q H R G F L L L T L L A L L
MDK2	MDK4-18	R G F L L L T L L A L L A L T
MDK3	MDK 9-23	L T L L A L L A L T S A V A K
MDK4	MDK14-28	L L A L T S A V A K K K D K V
MDK5	MDK 18-32	T S A V A K K K D K V K K G G
MDK6	MDK 25-39	K D K V K K G G P G S E C A E
MDK7	MDK 38-52	A E W A W G P C T P S S K D C
MDK8	MDK 52-64	C G V G F R E G T C G A Q T Q
MDK9	MDK 64-78	Q T Q R I R C R V P C N W K K
MDK10	MDK 70-84	C R V P C N W K K E F G A D C
MDK11	MDK 74-88	C N W K K E F G A D C K Y K F
MDK12	MDK 78-92	K E F G A D C K Y K F E N W G
MDK13	MDK 84-98	C K Y K F E N W G A C D G G T
MDK14	MDK 89-103	E N W G A C D G G T G T K V R
MDK15	MDK 99-113	G T K V R Q G T L K K A R Y N
MDK16	MDK 105-119	G T L K K A R Y N A Q C Q E T
MDK17	MDK 110-124	A R Y N A Q C Q E T I R V T K
MDK18	MDK 119-133	E T I R V T K P C T P K T K A

* les positions sont numérotées en référence à la séquence du précurseur de la Midkine humaine de 143 acides aminés (SwissProt P21741, figure 1 et SEQ ID NO: 2).

b) Test de liaison HLA II/peptide

Les tests de liaison aux molécules HLA II sont des tests de liaison en compétition avec une révélation immuno-enzymatique, tels que décrits dans le brevet américain US 6,649,166 et la Demande Internationale PCT WO 03/040299, respectivement pour les molécules HLA-DR et HLA-DP4. La mise ne œuvre de ces tests pour mesurer l'activité de liaison de peptides issus de différents antigènes, est illustrée dans le brevet américain US 6,649,166 et les Demandes Internationale PCT WO 02/090382, WO 03/040299 et WO 2004/014936.

De manière plus précise, les peptides : HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT, SEQ ID NO: 31), A3 152-166 (EAEQLRAYLDGTGVE, SEQ ID NO: 32), MT 2-16 (AKTIAYDEEARRGLE, SEQ ID NO: 33), B1 21-36 (TERVRLVTRHIYNREE, SEQ ID NO: 34) YKL (AAYAAAKAAALAA, SEQ ID NO: 35), LOL 191-210 (ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT, SEQ ID NO: 36), Oxy 271-287 (EKKYFAATQFEPLAARL, SEQ ID NO: 37) et E2/E168 (AGDLLAIETDKATI SEQ ID NO : 38), biotinylés au niveau du résidu NH₂ terminal, selon le protocole décrit dans Texier *et al.*, J. Immunol., 2000, 164, 3177-3184), sont utilisés comme traceur dans les conditions telles que précisées dans le ci-après.

TABLEAU VI : Conditions des tests de liaison aux molécules HLA II

Allèles	Dilution de HLA II	Traceurs	Concentration traceur (nM)	pH optimal	Temps d'incubation (h)	IC ₅₀ (nM)
DRB1*0101	1/40	HA 306-318	1	6	24	2
DRB1*0301	1/20	MT 2-16	100	4,5	72	239
DRB1*0401	1/60	HA 306-318	10	6	24	6
DRB1*0701	1/80	YKL	10	5	24	4
DRB1*1101	1/80	HA 306-318	10	5	24	9
DRB1*1301	1/40	B1 21-36	100	4,5	72	39
DRB1*1501	1/100	A3 152-166	30	4,5	72	19
DRB4*0101	1/30	E2/E168	10	5	72	3
DRB5*0101	1/80	HA 306-318	10	5,5	24	5
DRB3*0101	1/40	Lol 191-120	20	5,5	24	21
DBP1*0401	1/100	Oxy 271-287	10	5	24	11
DPB1*0402	1/40	Oxy 271-287	10	5	24	10

La sensibilité de chaque test est reflétée par les IC_{50} observées avec les peptides non-biotinylés qui correspondent aux traceurs. La concentrations (nM) de peptide compétiteur qui inhibe 50% de la liaison maximale du peptide traceur biotinylé (IC_{50}) a été calculée pour chaque peptide. Les résultats sont exprimés sous la forme d'activité relative (rapport de l' IC_{50} du peptide compétiteur sur celle du peptide de référence (peptides non-biotinylé qui correspond au traceur)). Une activité relative inférieure à 100 caractérise les peptides actifs.

c) Obtention de lignées de lymphocytes T CD4+ spécifiques de peptides de la Midkine et restreintes aux molécules HLA II prépondérantes

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) d'individus sains dont le génotype HLA-DR et HLA-DP a été préalablement déterminé par SSP, à l'aide du kit OLERUP SSP™ HLA-DPB1 et HLA-DRB1, ont été séparées sur un gradient de Ficoll. Les PBMCs ont ensuite été mises en culture dans du milieu AIM V (LIFE TECHNOLOGIES) et incubées dans des flasques, à l'étuve à 37°C en présence de 5% CO_2 /95 % air. Après une nuit d'incubation, les cellules non adhérentes ont été récupérées, puis les lymphocytes T CD4+ ont été purifiées à l'aide d'anticorps anti-CD4 couplés à des billes magnétiques (kit MYLTENYI BIOTEC), et congelés. Les cellules adhérentes ont été incubées pendant 5 jours, dans du milieu AIM V contenant 1000 U/ml de GM-CSF et 1000 U/ml d'IL-4, puis les cellules différenciées en cellules dendritiques (cellules dendritiques immatures) ont ensuite été cultivées pendant 2 jours, en présence de 1 μ g/ml de LPS, 1000 U/ml d'IL-4 et 1000 U/ml de GM-CSF, de manière à induire leur maturation.

Les cellules dendritiques matures (100 000 cellules/puits) ont alors été incubées avec un mélange de peptides (10 μ g de chaque peptide dans du milieu IMDN (INVITROGEN) supplémenté avec de la glutamine (24 mM, SIGMA), de l'asparagine (55 mM, SIGMA), de l'arginine (150 mM, SIGMA), de la pénicilline (50UI/ml, INVITROGEN), de la streptomycine (50 mg/ml, INVITROGEN) et 10 % de sérum humain)), pendant 4 heures à 37°C. Les cellules dendritiques matures ont ensuite été lavées puis incubées, en présence des lymphocytes T CD4+ (100 000 cellules/puits) préalablement décongelés, dans du milieu contenant 1000 U/ml d'IL-6 et 10 ng/ml d'IL-12. Après 7 jours (J7), la culture a été stimulée une première fois, au moyen de cellules dendritiques matures préalablement décongelées et chargées par

deux mélanges de peptides couvrant l'intégralité de la séquence de la Midkine (mélange des peptides MDK1 à MDK9 puis mélange des peptides MDK 1 à MDK18), dans du milieu contenant de l'IL-2 (10 U/ml) et de l'IL-7 (5 ng/ml). Après trois stimulations supplémentaires (J14, J21, J28) au moyen de cellules dendritiques chargées, dans du milieu contenant uniquement de l'IL-7 (5 ng/ml), les cellules ont été testées en ELISPOT, 6 jours au moins après la dernière stimulation.

d) ELISPOT

Des anticorps anti-IFN- γ (1-D1K, MABTECH) dilués à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dans du tampon PBS ont été adsorbés sur des plaques de nitrocellulose (MILLIPORE) pendant 1 heure à 37°C. Les plaques ont ensuite été lavées avec du PBS puis saturées avec du milieu ISCOVE contenant 10 % de sérum humain du groupe AB (100 $\mu\text{l/puits}$), pendant 2 h à 37 °C. Les cellules présentatrices d'antigène sont, soit des cellules dendritiques autologues immatures préparées comme précisé ci-dessus, soit une lignée de fibroblastes de souris (lignée L), transfectée avec l'ADNc codant pour l'une des molécules HLA-DR ou HLA-DP4 à tester (Yu *et al.*, Hum. Immunol., 1990, 27, 132-135), de façon à vérifier la spécificité des lignées vis-à-vis des molécules HLA-DR et HLA-DP4. Les cellules dendritiques (10⁵ cellules/puits) ou des cellules L transfectées par l'une des molécules HLA-DR ou HLA-DP4 (30 000 cellules/puits) et 5000 lymphocytes à tester ont ensuite été ajoutés dans les plaques et incubées 24 h à 37°C, en présence ou en l'absence d'un seul peptide (10 μg) ou d'un mélange de peptides (10 μg de chaque peptide). Après trois lavages successifs avec de l'eau, du tampon PBS Tween 0,05%, et du PBS seul, 100 μl d'anticorps secondaire anti-IFN- γ conjugué à la biotine (7-B6-1-biotin, MABTECH), dilué à 0,25 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS contenant 1% BSA, a été ajouté dans chaque puits. Après une heure d'incubation, les plaques ont été lavées à nouveau et incubées avec 100 $\mu\text{l/puits}$ d'Extravidin-AKP (E-2636, SIGMA,), diluée au 1/6000. Après lavage des plaques en tampon PBS, 100 μl de substrat NBT/BCIP (B-5655, SIGMA) dilué dans de l'eau (1 tablette dans 10 ml d'eau) ont été distribués dans chaque puits. La révélation immunoenzymatique a été arrêtée après environ 10 minutes, par rinçage extensif des plaques dans l'eau, et les spots colorés ont été comptés à l'aide d'un lecteur automatique (AID). Les lignées sont considérées positives lorsque le nombre de spots est supérieur à trois fois celui

obtenu avec le témoin négatif (témoin sans peptides) avec un minimum de 50 spots. Le témoin sans cellules présentatrices permet de vérifier la spécificité de la réponse pour HLA-DR ou HLA-DP4 (témoin de restriction).

5 e) Reconnaissance de cellules tumorales par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des peptides de la Midkine

10 Les lignées tumorales testées sont la lignée Hep G2 qui exprime la Midkine, la lignée tumorale Hela qui n'exprime pas la Midkine et la lignée Hela-pMDK qui correspond aux cellules HeLa transfectées transitoirement par un plasmide d'expression de la Midkine tel que décrit à l'exemple 1. Les cellules collectées ont été lysées par des cycles de congélation/ décongélation. La lignée 331.24 de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du peptide 9-23 de la Midkine a été incubée en présence de cellules dendritiques préalablement chargées par les lysats de lignées tumorales et son activation a été évaluée par Elispot comme précisé ci-dessus.

2) **Résultats**

15 a) Activité de liaison des peptides de la Midkine vis-à-vis des molécules HLA II

La plupart des sites de liaison aux molécules HLA de classe II se situent dans la partie N-terminale de la Midkine, c'est-à-dire dans le peptide signal (1-22; Tableau VII).

20 **Tableau VII : Activités relative de liaison* des peptides de la Midkine vis-à-vis des 12 molécules HLA II prépondérantes**

peptides	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5	DP401	DP402	Total
MDK1-15	21	>419	226	49	7	>2537	211	267	204	161	20	19	5
MDK4-18	21	>419	136	20	94	>2537	19	37	65	46	6	18	9
MDK9-23	0,2	>419	1	13	0,3	>2537	5	>485	>28 868	2	94	29	8
MDK14-28	34	>419	401	590	48	45	>529	>485	>28 868	0,1	>879	>976	4
MDK 18-32	>5 291	>419	>1 812	>2 479	>1 086	132	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	0
MDK 25-39	1 251	>419	>1 812	>2 479	>1 086	>2 537	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	0
MDK 38-52	1 305	>419	1 859	>2 479	923	>2 537	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	239	0
MDK 52-64	32	>419	701	>2 479	833	>2 537	>529	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	1
MDK 64-78	246	>419	558	2 066	504	>2 537	>529	>485	1 155	61	>879	>976	1
MDK 70-84	53	>419	1 562	>2 479	>1 086	>2 537	>529	621	>28 868	>2 100	7	>976	2
MDK 74-88	333	2	>1 812	>2 479	1 231	>2 537	>529	877	>28 868	714	>879	>976	1
MDK 78-92	299	1	457	>2 479	800	>2 537	216	226	>28 868	114	167	378	1
MDK 84-98	187	>419	362	>2 479	>1 086	>2 537	141	>485	>28 868	292	52	49	2
MDK 89-103	1 460	>419	>1 812	>2 479	>1 086	>2 537	>529	2 333	>28 868	>2 100	>879	>976	0
MDK 99-113	3 000	>419	>1 812	>2 479	>1 086	74	>529	>485	>28 868	215	>879	>976	1
MDK 105-119	97	>419	492	>2 479	1 008	>2 537	225	>485	>28 868	>2 100	>879	>976	1
MDK110-124	10	>419	6	158	69	>2 537	>529	>485	>28 868	15	>879	>976	4
MDK 119-133	2	>419	1 289	819	763	>2 537	>529	>485	>28 868	26	>879	>976	2

* les valeurs sont les moyennes d'au moins deux expériences indépendantes.

Les peptides de la région N-terminale ont une bonne affinité pour au moins 4 molécules HLA II molécules. En particulier, le peptide 9-23 se lie à 8 molécules HLA II différentes avec des affinités relatives traduisant souvent une haute affinité (activité relative inférieure à 10). D'autres peptides se lient également à plusieurs

5 molécules HLA II tels que les peptides 1-15, 4-18, 14-28.

En revanche, les peptides issus du reste de la séquence ne présentent pas d'activité de liaison significative pour au moins quatre molécules HLA II prépondérantes dans la population caucasienne, à l'exception d'un peptide de la région C-terminale (110-124) qui se lie avec une bonne affinité à quatre molécules HLA II.

10 b) Induction d'une réponse T CD4⁺ spécifique par les peptides de la Midkine

La capacité des peptides de la Midkine à induire *in vitro* une stimulation de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques, a été évaluée à partir de prélèvements sanguins d'individus sains (non porteurs de tumeur). Il s'agit d'évaluer la capacité à recruter des lymphocytes précurseurs CD4⁺ alors qu'ils sont chez un individu naïf à

15 une très faible fréquence, c'est-à-dire d'effectuer une immunisation *in vitro* au moyen de ces peptides.

Les lignées de lymphocytes T CD4⁺ 331.16, 331.24 et 343.1 ont été obtenues par stimulation *in vitro* de lymphocytes T au moyen de cellules dendritiques autologues matures chargés par deux pools de peptides couvrant l'intégralité de la

20 séquence de la Midkine. L'étude de leur spécificité a été faite par Elispot IFN- γ et a montré que les trois lignées étaient spécifiques du peptide 9-23. Chaque lignée a été testée par Elispot IFN- γ pour sa capacité à être stimulée par des cellules L transfectées par une molécule HLA-DR ou HLA-DP4 et chargées par le peptide 9-23. La figure 8 montre que le peptide 9-23 peut être présenté par la molécule DR7 aux lignées du

25 donneur 331 (331.16 et 331.24) et que la lignée 343.1 est restreinte à DR11 mais pas à DR15 et DRB5.

La lignée de lymphocytes T CD4⁺ 331.24 a été incubée en présence de cellules dendritiques préalablement chargées par les lysats de lignées tumorales et son activation a été évaluée par Elispot IFN- γ . La figure 9 montre que la lignée 331.24

30 est stimulée par des cellules dendritiques chargées par le lysat de cellules Hela transfectées mais pas par les cellules Hela non transfectées. Ceci confirme la spécificité de la lignée de lymphocytes T 331.24 et sa capacité à reconnaître la Midkine présente

dans le lysat de cellules transfectée. Elle reconnaît également la Midkine produite naturellement par lignée tumorale Hep G2.

L'ensemble des résultats montre que le peptide 9-23 se lie à 8 molécules HLA II différentes et induit une réponse T CD4⁺ spécifique *in vitro* qui est
5 restreinte à des molécules HLA de classe II différentes. De plus les cellules T CD4⁺ induites contre ce peptide peuvent reconnaître des lysats de tumeurs exprimant la Midkine et présentés par des cellules dendritiques. Comme ce peptide se chevauche avec le peptide signal (1-22), on peut déduire de ces expériences que le peptide 9-22 comporte également des épitopes T CD4⁺ dans la mesure où le peptide signal de la
10 Midkine est clivé dans la cellule entre les acides aminés 22 et 23. Il est intéressant de noter que les peptides 9-23 et 9-22 incluent les peptides 12-21, 13-21, 13-22 et 14-22 qui comportent des épitopes T CD8⁺. Les peptides 9-23 et 9-22 peuvent donc induire des réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques de tumeurs exprimant la Midkine.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite
15 nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Utilisation d'un peptide issu de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ restreint aux molécules HLA prépondérantes dans la population caucasienne ou d'un polynucléotide codant ledit peptide, pour la
5 préparation d'un vaccin anticancéreux.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit peptide est constitué par la protéine Midkine humaine de séquence SEQ ID NO : 2.

3°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit peptide est un fragment d'au moins 8 acides aminés de la protéine Midkine comprenant au moins un épitope T CD8⁺ restreint à la molécule HLA-A2, lequel peptide
10 comprend au moins les positions 14 à 21 ou 114 à 122 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine.

4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit peptide est constitué par les positions 12 à 21, 13 à 21, 13 à 22, 14 à 22, 113 à 122 ou
15 114 à 122 de la séquence en acides aminés de la protéine Midkine.

5°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit peptide est un fragment d'au moins 8 acides aminés de la Midkine comprenant au moins un épitope T CD4⁺ restreint à au moins quatre molécules HLA II différentes prépondérantes dans la population caucasienne, lequel peptide comprend au moins les
20 positions 9 à 15, 14 à 28 ou 110 à 124 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine.

6°) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit peptide est constitué par les positions 1 à 15, 4 à 18 ou 14 à 28 de la séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine.

7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1, 3 et 5, caractérisée en ce que ledit peptide comprend au moins un épitope T CD8⁺ restreint à la molécule HLA-A2 et au moins un épitope T CD4⁺ restreint à au moins quatre molécules HLA II différentes prépondérantes dans la population caucasienne, lequel peptide est constitué par les positions 9 à 21, 9 à 22, 9 à 23 ou 110 à 124 de la
30 séquence en acides aminés de ladite protéine Midkine.

8°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit peptide est un peptide multi-épitopique comprenant la

concaténation d'au moins deux épitopes identiques ou différents dont l'un au moins est un épitope T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ de la Midkine tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

5 9°) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit peptide multi-épitopique comprend un épitope T CD4⁺ ou T CD8⁺ d'un autre antigène tumoral.

10°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ledit peptide est fusionné à une protéine ou un fragment de protéine hétérologue.

10 11°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit peptide est un lipopeptide.

12°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polynucléotide code pour un peptide tel que défini à l'une quelconque des revendications 2 à 10.

15 13°) Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit polynucléotide est inséré dans un vecteur d'expression.

14°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que ledit vaccin comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une substance porteuse et/ou un adjuvant.

20 15°) Utilisation d'un peptide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la préparation d'un réactif d'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine, destiné à l'évaluation du pronostic ou au suivi du traitement d'un cancer.

25 16°) Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit peptide est sous la forme de tétramères de complexes molécule HLA/peptide, marqués.

30 17°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que le cancer est sélectionné dans le groupe constitué par: les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du colon, du pancréas, de la thyroïde, des poumons, du sein, de la vessie, de l'utérus, de l'ovaire, de la prostate, les carcinomes hépatocellulaires, les ostéosarcomes, les neuroblastomes, les glioblastomes, les astrocytomes, les leucémies et les tumeurs de Wilm.

18°) Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide tel que défini à l'une quelconque des revendications 3 à 11 ou un vecteur tel que défini à la revendication 13, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une substance porteuse ou un adjuvant.

5 19°) Méthode *in vitro*, d'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine chez un individu présentant un cancer, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un échantillon biologique dudit individu avec un peptide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 10 et 16, et

10 - la détection de lymphocytes T CD4+ et/ou T CD8+ spécifiques de la Midkine, par tout moyen approprié.

20°) Kit d'immunomonitoring de la réponse cellulaire contre la Midkine, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 10 et 16.

15 21°) Peptide issu de la Midkine tel que défini à l'une quelconque des revendications 3 à 11.

22°) Polynucléotide codant le peptide selon la revendication 21.

23°) Vecteur d'expression comprenant le polynucléotide selon la revendication 22.

20 24°) Cellule hôte modifiée par le polynucléotide selon la revendication 22 ou le vecteur selon la revendication 23.

1/10

1 11 21 31
MQHRGFLLLT LLALLAL TSA VAKKKDKVKK GPGSECAEW

41 51 61 71
AWGPCTPSSK DCGVGFREGT CGAQTQRIRC RVPCNWKKEF

81 91 101 111
GADCKYKFEN WGACDGGTGT KVRQGTLLKKA RYNAQCQETI

121 131 141
RVTKPCTPKT KAKAKAKKGGK GKD

FIGURE 1

2/10

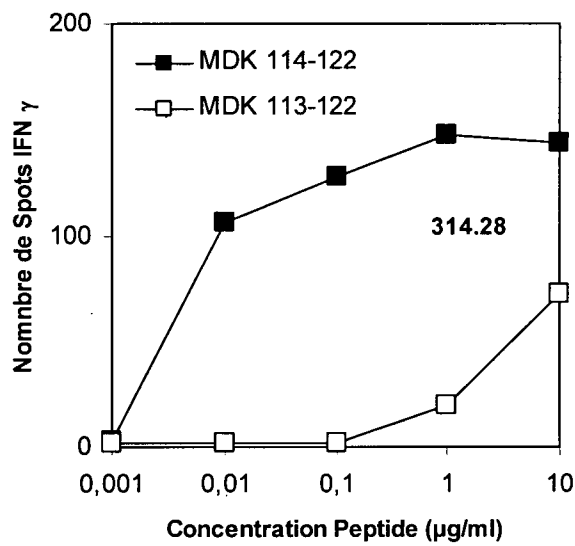
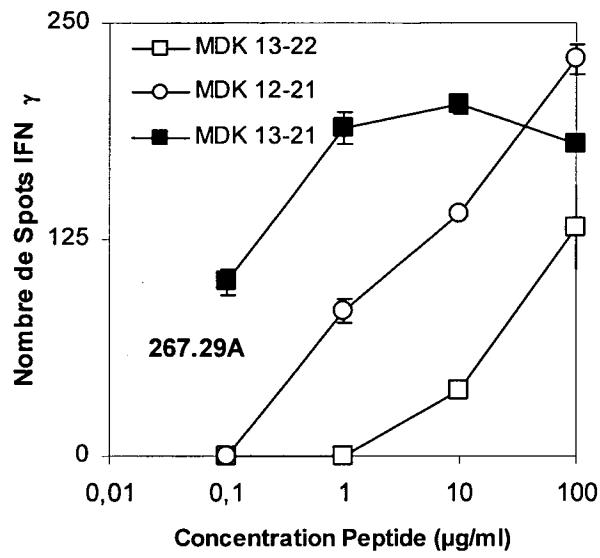


FIGURE 2

3/10

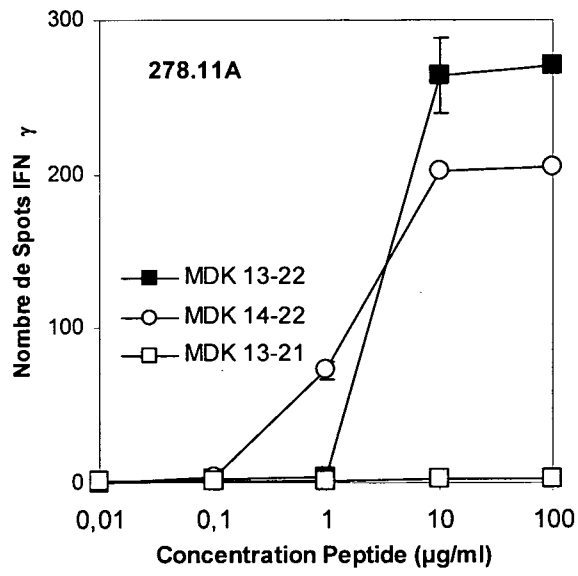


FIGURE 2 (SUITE)

4/10

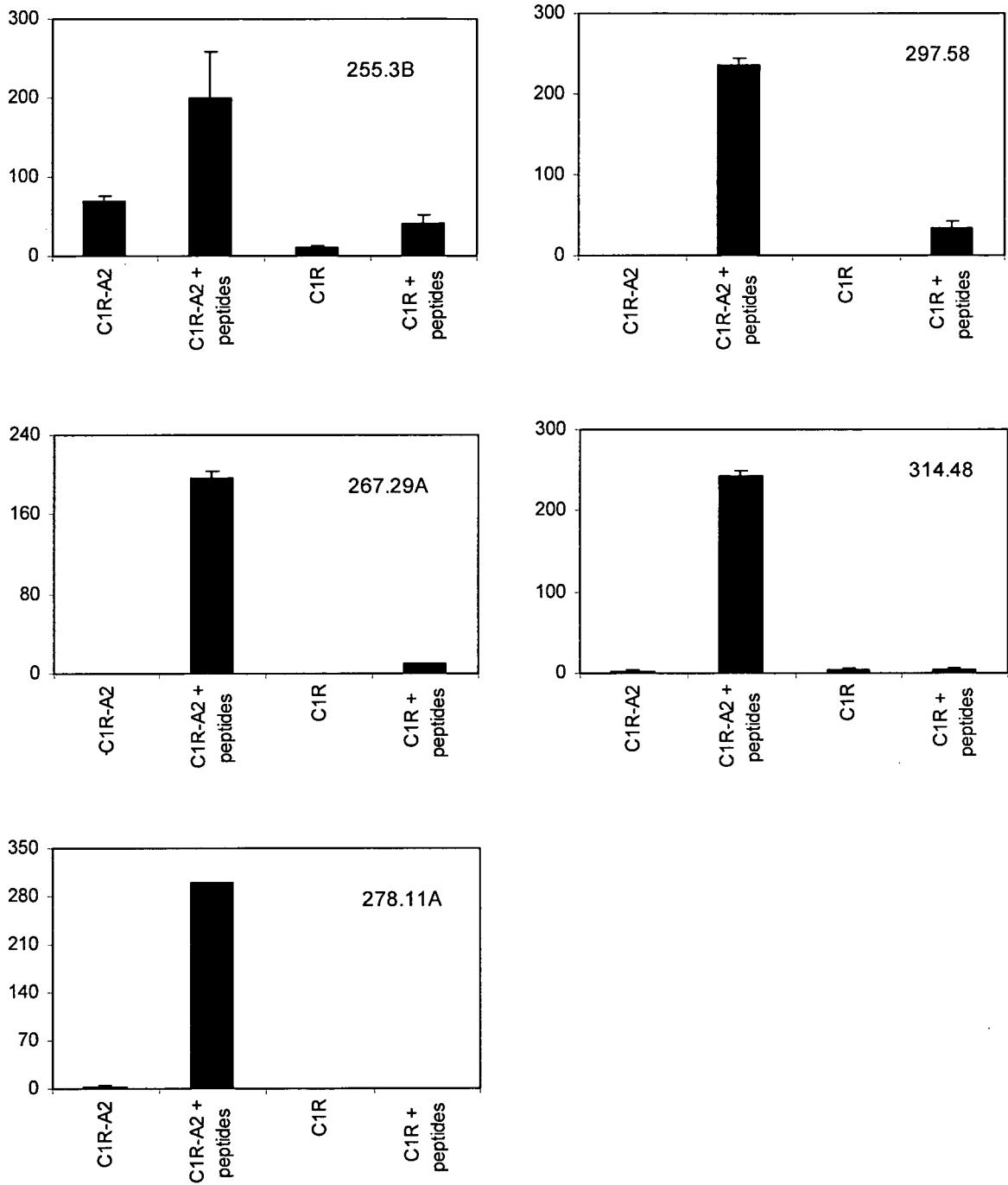


FIGURE 3

5/10

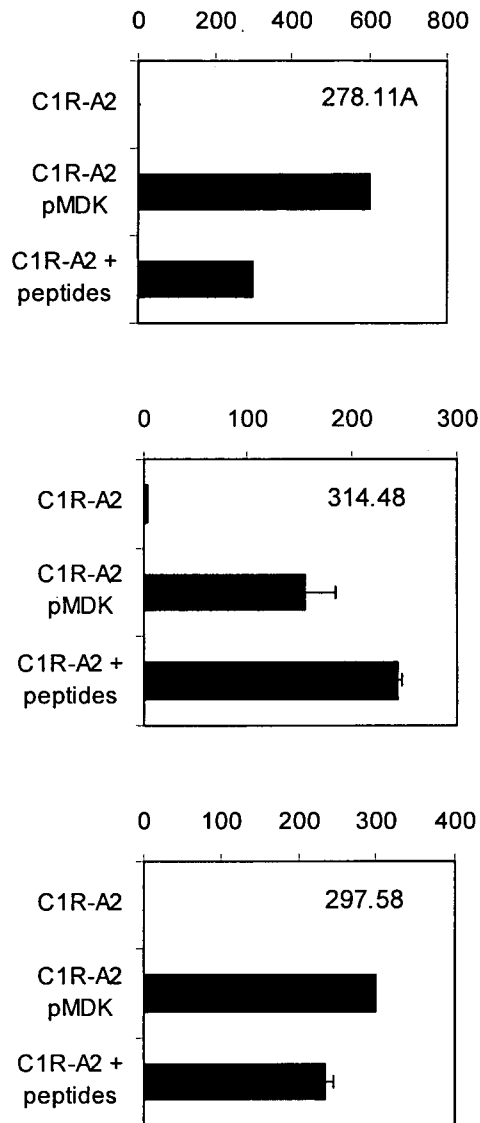


FIGURE 4

6/10

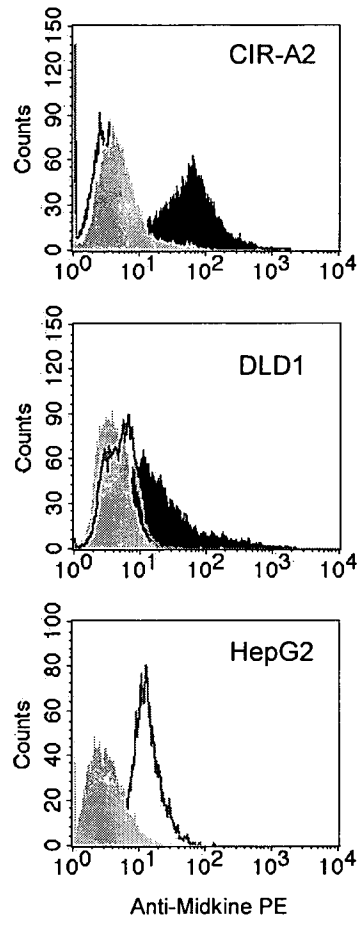


FIGURE 5

7/10

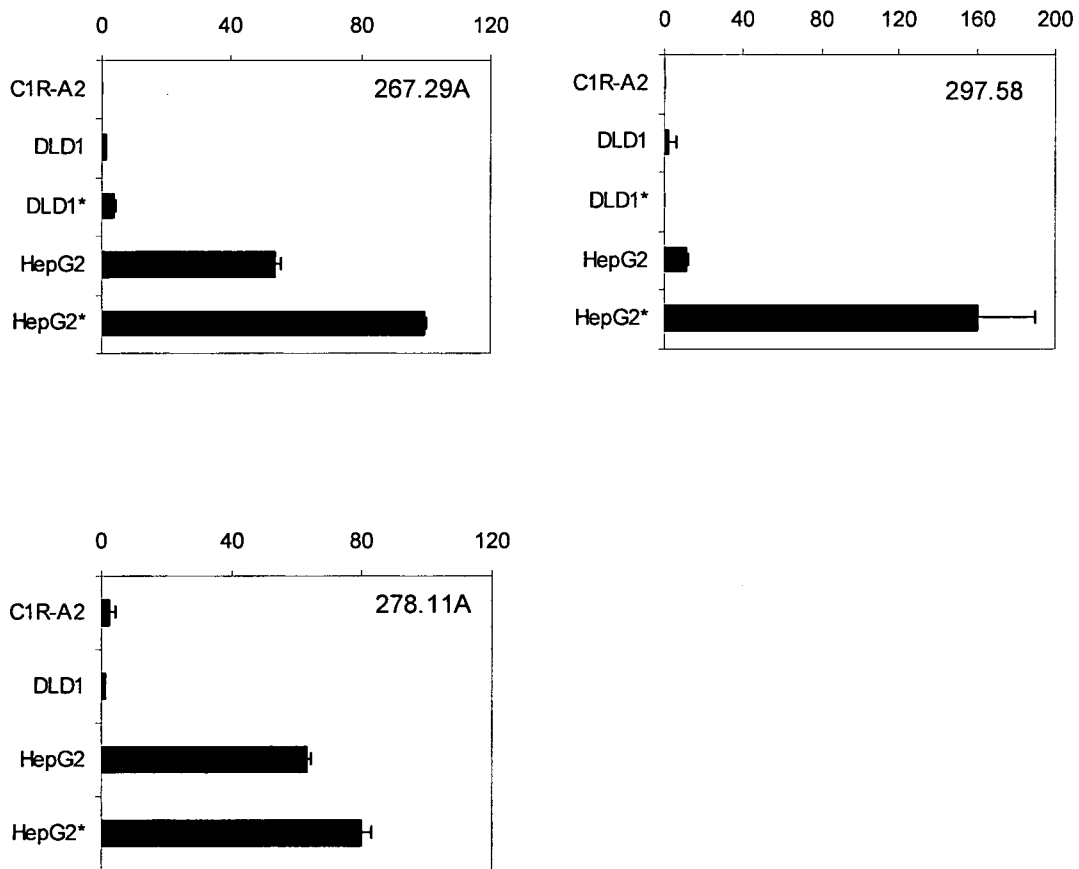


FIGURE 6

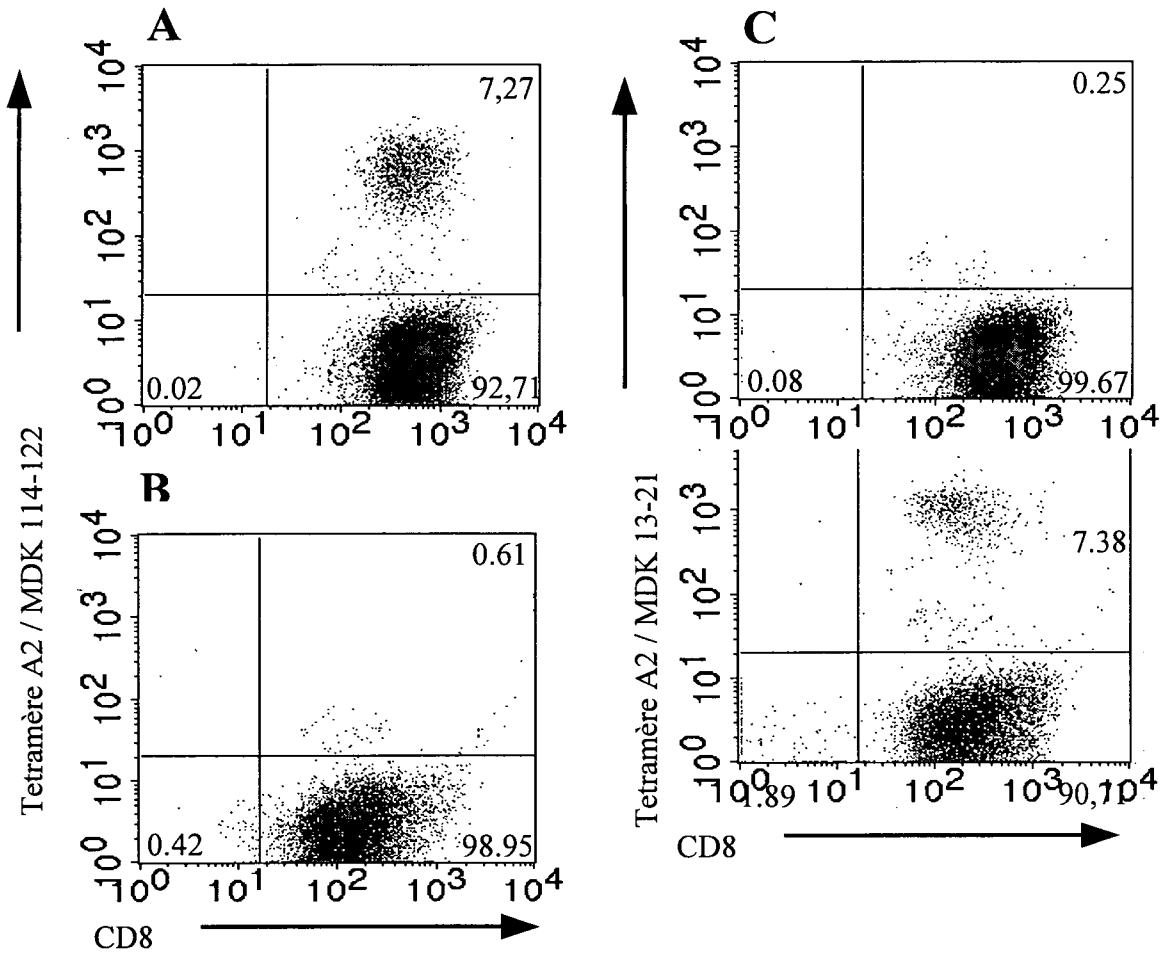


FIGURE 7

9/10

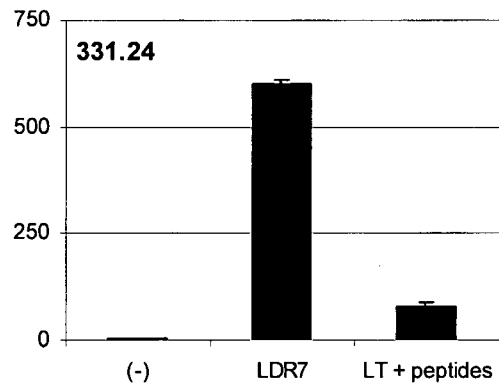
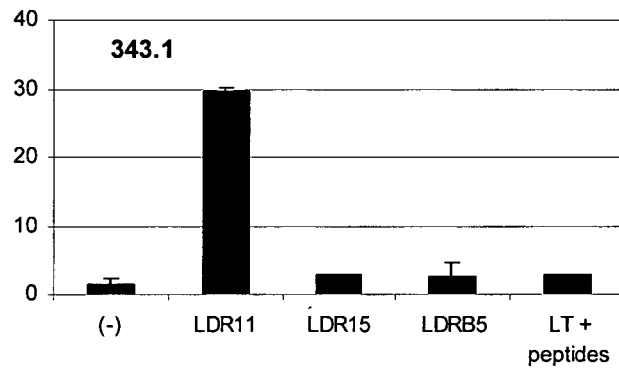
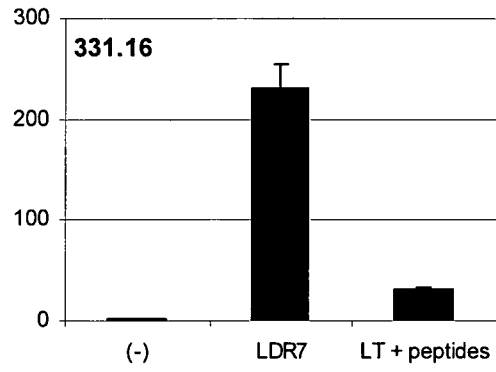


FIGURE 8

10/10

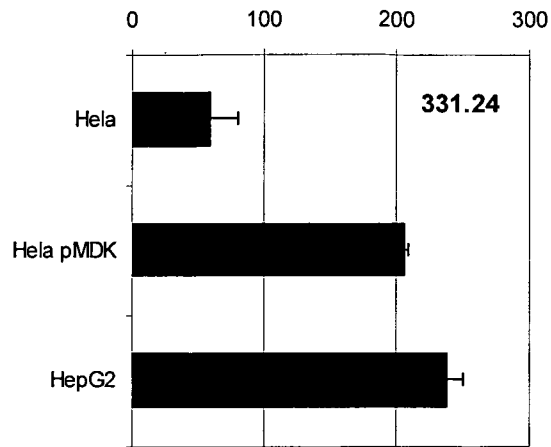


FIGURE 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/000744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 C07K14/475 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/219614 A1 (MITSUMOTO TOMOHIRO [JP] ET AL) 4 November 2004 (2004-11-04) examples 1,2	20-24
A	<p style="text-align: center;">-----</p> HIDAKA HIROKAZU ET AL: "Increased midkine gene expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia." LEUKEMIA RESEARCH AUG 2007, vol. 31, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 1045-1051, XP002513652 ISSN: 0145-2126 the whole document <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents :
- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - *E* earlier document but published on or after the international filing date
 - *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 - *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 - *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 - *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 - *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">11 novembre 2009</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">26/11/2009</p>
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center;">Hermann, Patrice</p>
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/000744

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOON HYE-SUNG ET AL: "Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer." GYNECOLOGIC ONCOLOGY MAR 2003, vol. 88, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 289-297, XP002513653 ISSN: 0090-8258 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24
A	<p>MAEDA S ET AL: "Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma." BRITISH JOURNAL OF CANCER 6 AUG 2007, vol. 97, no. 3, 6 August 2007 (2007-08-06), pages 405-411, XP002513654 ISSN: 0007-0920 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24
A	<p>REN YING-JIA ET AL: "Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma." WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY : WJG 7 APR 2006, vol. 12, no. 13, 7 April 2006 (2006-04-07), pages 2006-2010, XP002513655 ISSN: 1007-9327 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/000744

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004219614 A1	04-11-2004	JP 3920556 B2	30-05-2007
		JP 2002125666 A	08-05-2002
		US 2007154949 A1	05-07-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/000744

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K39/00 C07K14/475 A61P35/00				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE				
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K C07K				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	US 2004/219614 A1 (MITSUMOTO TOMOHIRO [JP] ET AL) 4 novembre 2004 (2004-11-04) exemples 1,2 -----	20-24		
A	HIDAKA HIROKAZU ET AL: "Increased midkine gene expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia." LEUKEMIA RESEARCH AUG 2007, vol. 31, no. 8, août 2007 (2007-08), pages 1045-1051, XP002513652 ISSN: 0145-2126 le document en entier ----- style="text-align: center;">-/--	1-24		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités:				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée </td> <td style="width: 50%; border: none;"> *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *8* document qui fait partie de la même famille de brevets </td> </tr> </table>			*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *8* document qui fait partie de la même famille de brevets
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *8* document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <p style="text-align: center;">11 novembre 2009</p>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <p style="text-align: center;">26/11/2009</p>		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <p style="text-align: center;">Hermann, Patrice</p>		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/000744

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOON HYE-SUNG ET AL: "Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer." GYNECOLOGIC ONCOLOGY MAR 2003, vol. 88, no. 3, mars 2003 (2003-03), pages 289-297, XP002513653 ISSN: 0090-8258 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24
A	<p>MAEDA S ET AL: "Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma." BRITISH JOURNAL OF CANCER 6 AUG 2007, vol. 97, no. 3, 6 août 2007 (2007-08-06), pages 405-411, XP002513654 ISSN: 0007-0920 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24
A	<p>REN YING-JIA ET AL: "Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma." WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY : WJG 7 APR 2006, vol. 12, no. 13, 7 avril 2006 (2006-04-07), pages 2006-2010, XP002513655 ISSN: 1007-9327 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/000744

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2004219614 A1	04-11-2004	JP 3920556 B2	30-05-2007
		JP 2002125666 A	08-05-2002
		US 2007154949 A1	05-07-2007
